Aus dem Institut für Blutgerinnungs- und Transfusionsmedizin der Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. med. H. T. Brüster

Bestimmung des Hepatitis-B-Core-Antigens und seiner Antikörper im Enzymimmunoassay

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Hermann Peters

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543909_0067

Aus dem Institut für Blutgerinnungs- und Transfusionsmedizin der Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. med. H. T. Brüster

Bestimmung des Hepatitis-B-Core-Antigens und seiner Antikörper im Enzymimmunoassay

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Hermann Peters

1983

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der

Universität Düsseldorf

Der Dekan

der Medizinischen Fakultät

der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Hopf

Referent

gez.: Prof. Dr. Brüster

Korreferent

gez.: Prof. Dr. Schulte

Meiner Ehefrau und meinen Eltern

gewidmet!

Inhaltsverzeichnis

		Seite
Einleitung		3
I.	Entwicklung eines Enzymimmunoassays zur Bestimmung von Hepatitis-B-core-Antigen	12
	Einführung	12
	Materialien und Methoden	14
	Ergebnisse	23
	Diskussion	55
II.	Entwicklung eines Enzymimmunoassays zur Bestimmung der Antikörper gegen Hepatitis-B-core-Antigen	62
	Einführung	62
	Materialien und Methoden	64
	Ergebnisse	66
	Diskussion	73
III.	Entwicklung eines Enzmimmunoassays zur Bestimmung der Antikörper der IgM-Klasse gegen Hepatitis-B-core-Antigen	75
	Einführung	75
	Materialien und Methoden	77
	Ergebnisse	80
	Diskussion	89
Zusammenfassung		92
Abkürzungen		94
Literatur		95

I. Einleitung

Allgemeines

Der großen Bedeutung der Virushepatitis entsprechend sind in den letzten Jahren große Fortschritte in der Erforschung dieser Erkrankungsgruppe gemacht worden.
Neben der Hepatitis-B, mit der sich diese Arbeit ausschließlich beschäftigt, werden zu den Virushepatitiden die Hepatitis-A und die Hepatitis-non-A-non-B gerechnet. Seltener werden Hepatitiden durch das Ebstein-Barr-Virus, Cytomegalievirus, Herpesvirus und das Gelbfiebervirus hervorgerufen.
Das Hepatitis-A-Virus konnte in den vergangenen Jahren eindeutig identifiziert werden und gehört zu der Gruppe der Picorna-Viren (13). Die Virusausscheidung erfolgt im Stuhl, hat jedoch bei Einsetzen der Krankheitssymptome ihren Höhepunkt häufig schon überschritten. Der Nachweis einer Hepatitis-A-Infektion erfolgt durch Bestimmung der Antikörper der IgM-Klasse gegen das Hepatitis-A-Antigen auf der Oberfläche des HAV.
Die Diagnose einer Hepatitis-non-A-non-B kann bisher nur per Ausschluß einer anderen Ursache gestellt werden, da bis jetzt kein Routinetestsystem für diese Hepatitisform zur Verfügung steht (69).

Epidemiologie der Hepatitis-B

Die Hepatitis-B wird bei einer Inkubationszeit von 2-6 Monaten vorwiegend parenteral übertragen. Kontaminiertes Blut und Blutbestandteile können als Infusion, perkutan über eine Verletzung oder durch Aufnahme über die Schleimhäute, z. B. durch Blutspritzer in den Mund oder ins Auge, zu einer Infektion führen. Die Konzentration der Viruspartikel kann 10^8-10^{10} Viren pro ml Serum betragen, so daß auch kleinste Mengen für eine Infektion ausreichen. Weiterhin wurde nachgewiesen, daß Speichel und Samenflüssigkeit infektiös sein können. Das gleiche wird auch für andere Körpersekrete vermutet (52).

In Endemiegebieten der Hepatitis-B stellt die perinatale Infektion des Kindes durch die Mutter, die Virusträgerin ist, einen der wichtigsten Übertragungswege dar. Im Gegensatz zur Hepatitis-A scheint die Hepatitis-B nicht durch infektiösen Stuhl übertragen zu werden (52).
Bisher konnte eine Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus außer beim Menschen experimentell nur bei Schimpansen und Gibbon-Affen nachgewiesen werden.
Das größte Erregerreservoir bildet die große Zahl der HBsAg-Träger und der Erkrankten in den Endemiegebieten des Mittelmeerraumes, Teilen von Afrika, Asien, Ozeanien und Südamerika mit einer Prävalenz von 5-10%. In absoluten Zahlen bedeutet dies, daß 150-200 Millionen Menschen an Hepatitis-B-Virusbefall leiden. In Westeuropa, Nordamerika und Australien beträgt die Prävalenz 0,1-1% (52).
Neben den akut Erkrankten als Ansteckungsquelle und Erregerreservoir werden etwa 5-10% der erwachsenen Erkrankten Träger des Virus und bleiben somit potentiell infektiös. Bei Kindern soll die Zahl der Virusträger sogar 50% der Infizierten betragen (29). Dabei können sie symptomlose Träger des Virus sein.
Eine weitere Möglichkeit ist der Übergang der Hepatitis in ein chronisches Stadium (chronisch aktive Hepatitis oder chronisch persistierende Hepatitis). Als prognostisch ungünstiges Zeichen gilt das gleichzeitige Persistieren von HBeAg (69).
Eine Spätfolge der chronischen Hepatitis-B-Infektion scheint das Leberzellkarzinom zu sein (54).

Morphologie

Das Hepatitis-B-Virus selbst, dessen morphologisches Korrelat 1970 von Dane et al. in den nach ihm benannten Dane-Partikeln in infektiösem Serum beschrieben wurde, besteht aus einer Hülle und einem Viruskern (12). Die Virushülle hat einen Durchmesser von 16-25 nm und besteht aus einem Protein-, Lipid- und Kohlenhydratanteil. Dieses Hüllmaterial findet man im Überschuß als sphärische Partikel und Filamente im Serum eines akut Erkrankten. Bereits 1965 entdeckten Blumberg et al.

das auf der Oberfläche dieser Hüllpartikel lokalisierte "Australia-Antigen", das jetzt Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg) genannt wird (52). 1971 fanden Almeida et al. im Viruskern das Hepatitis-B-core-Antigen (HBcAg), das sich vom HBsAg unterscheidet (1). Zum Viruskern gehören neben dem HBcAg eine doppelsträngige DNS, eine Hepatitis-B-Virus-spezifische DNS-Polymerase und eine Phosphokinase (69).
1972 beschrieben Magnius et al. ein drittes Hepatitis-B assoziiertes Antigen-Antikörpersystem, HBeAg, das als Zeichen der Infektiosität eines HBsAg-positiven Serums gilt (52).
1977 entdeckte Rizetto das Delta-Antigen, das einem Anteil eines RNS-Virus entspricht. Die Vermehrung dieses Virus ist an das Vorhandensein des Hepatitis-B-Virus gebunden (52).
Inzwischen gelang es, das HBV-Genom zu entschlüsseln (4, 9, 23, 62). Es besteht aus einer zirkulären, doppelsträngigen DNS von etwa 3200 Basenpaaren. Der zweite DNS-Strang ist unvollständig ausgebildet; er kann jedoch durch Zugabe der entsprechenden Nukleotide durch die DNS-Polymerase vervollständigt werden. Der Nachweis der DNS-Polymeraseaktivität bedeutet Replikation kompletter Viruspartikel und ist ein Hinweis für die Infektiosität des Blutes (54).
Große Fortschritte wurden auf dem Gebiet der Hepatitis-B-Schutzimpfung gemacht. Die passive Schutzimpfung wird mit Hepatitis-B-Hyperimmunglobulin durchgeführt, das aus Seren mit sehr hohem Anti-HBs-Titer gewonnen wird. Seit 1982 gibt es in der Bundesrepublik vom Paul Ehrlich Institut zugelassene Impfstoffe zur aktiven Immunisierung gegen Hepatitis-B. Sie enthalten HBsAg, das in mehreren Schritten gereinigt und inaktiviert wird. Die Impfstoffe sind inzwischen erfolgreich angewandt worden.

Hepatitis-B-Antigen-Antikörpersysteme

Wir unterscheiden folgende Antigen- und Antikörpersysteme:
HBsAg/Anti-HBs
HBcAg/Anti-HBc
HBeAg/Anti-HBe

Die genannten Antigen- und Antikörpersysteme werden kurz dargestellt, soweit sie für diese Untersuchung nur eine untergeordnete Rolle spielen. Auf die Bedeutung des HBcAg und des Anti-HBc wird ausführlich im nächsten Abschnitt eingegangen.

Ein Schema einer Hepatitis-B-Infektion veranschaulicht die zeitliche Abfolge des Auftretens der meßbaren Antigene und ihrer Antikörper im Serum eines typischen Falles:

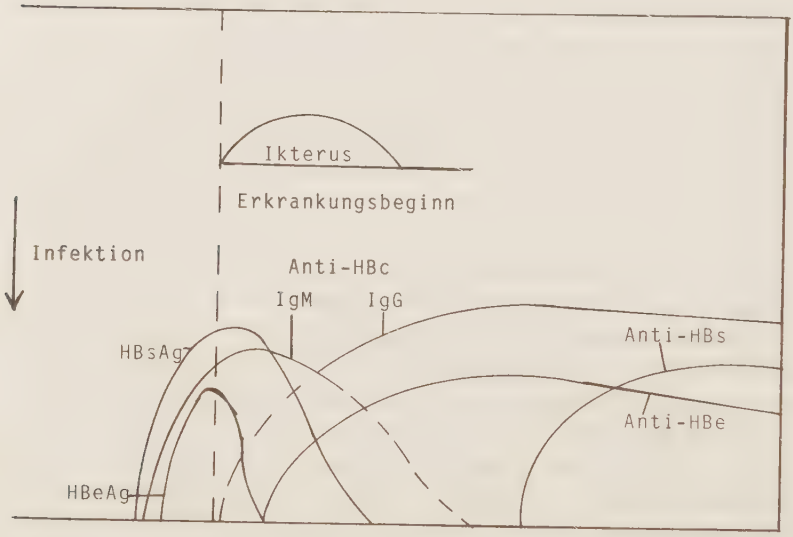


Abbildung 1: Schema einer Hepatitis-B-Infektion
(entnommen aus Frösner, G. G. et al. (20),
modifiziert nach Zachoval, R. et al. (69))

Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg)

Das HBsAg ist der labormedizinische Parameter, der zur Erkennung einer frischen Hepatitis-B-Infektion große Bedeutung erlangt hat. Es wird häufig schon vor Ausbruch der klinischen Symptome der Erkrankung nachweisbar und persistiert im Serum einige Wochen während der akuten Erkrankungsphase (20). Sinkt die Konzentration des HBsAg im Serum nicht innerhalb von 20 Tagen nach Beginn der klinischen Symptome auf unter 50% der Ausgangskonzentration, so ist damit zu rechnen, daß entweder ein symptomloser HBsAg-Trägerstatus erreicht wird oder daß sich zusätzlich eine chronische Hepatitisform entwickelt (69).

Die sphärischen Partikel und Filamente, die das HBsAg tragen, haben einen Durchmesser von 20-22 nm und eine Dichte von 1,19-1,23 CsCl g/ml. Man unterscheidet mehrere Subtypen des HBsAg. Es existiert jedoch eine gemeinsame Determinante "a" (69).

Antikörper gegen HBsAg (Anti-HBs)

Anti-HBs tritt als letzter Antikörper im Serum auf und zeigt die Beendigung der Immunreaktion an. Es bedeutet die Genesung von der akuten Phase der Erkrankung. Die Antikörper persistieren über Jahre im Serum und bedeuten für den Körper Immunität gegenüber dem Hepatitis-B-Virus.

Hepatitis-B-e-Antigen (HBeAg)

Erst mit empfindlichen Methoden, wie z. B. Radioimmunoassay (RIA), gelang es, das HBeAg regelmäßig nachzuweisen. Das Auftreten des HBeAg weist auf die Infektiosität eines HBsAg-positiven Serums hin (20).
Takahashi et al. (60) isolierten Dane-Partikel aus Serum und behandelten sie mit dem Detergenz Nonidet P40 und 2-Merkaptoäthanol. Dabei stellten sie im Serum eine HBcAg-, jedoch keine HBeAg-Aktivität fest. Eine Weiterbehandlung des HBcAg- und Dane-Partikel-haltigen Serums mit dem Enzym Pronase ergab eine geringe HBeAg-Aktivität. Bei der anschließenden Behandlung mit SDS (s. Abkürzungen S. 94) entwickelte sich eine hohe

HBeAg-Aktivität, so daß man HBeAg für einen Anteil der Dane-Partikel-Kerne halten muß (60).

Antikörper gegen HBeAg (Anti-HBe)

Anti-HBe tritt als immunologische Reaktion des Körpers kurz nach Verschwinden des HBeAg im Serum auf (siehe Schema). Auf HBeAg ist im Rahmen dieser Untersuchung noch gesondert einzugehen, da das HBcAg aus Lebermaterial mit dem Radioimmunoassay für HBeAg nachgewiesen wurde. Die Gründe werden im Kapitel "Probleme" und in der Diskussion eingehend erläutert.

Bedeutung des HBcAg

Das HBcAg kommt in seiner freien, antigenwirksamen Form im Serum nicht vor. Daher ist eine Isolierung des HBcAg in großer Menge bisher mit Schwierigkeiten behaftet gewesen. Das HBcAg kann aus Dane-Partikeln durch Detergentienbehandlung isoliert werden (60). Die resultierenden Viruskerne besitzen einen Durchmesser von 27 nm und weisen im CsCl-Dichtegradienten eine Dichte von 1,28-1,32 g/ml auf. Sie beträgt 1,34-1,36 g/ml, wenn die Core-Partikel Virus-DNS und DNS-Polymerase enthalten (54).
Eine weitere Möglichkeit, HBcAg zu isolieren, besteht in der Extraktion aus Leberzellkernen, in denen ihre Synthese stattfindet. Voraussetzung dafür ist, daß eine infizierte menschliche Leber zur Verfügung steht. Auch in diesem Fall finden sich im CsCl-Dichtegradienten zwei verschiedene Dichten, zum einen Core-Partikel mit einer Dichte von 1,30 g/ml und zum anderen von 1,32-1,33 g/ml. Letztere enthalten zusätzlich HBV-DNS und DNS-Polymerase. Untersuchungen des Core-Proteinanteils ergaben ein Polypeptid von 19000-21000 Dalton. Antigenvarianten wie beim HBsAg wurden beim HBcAg bisher nicht gefunden (54).

Bedeutung des Anti-HBc

Dem Anti-HBc kommt in der Routinediagnostik größere Bedeutung zu als dem HBcAg, da es z. B. mit der Radioimmunoassay-Technik direkt im Plasma oder Serum nachgewiesen werden kann. Es tritt im Verlauf einer akuten Hepatitis-B-Infektion früh auf und ist häufig bei Erkrankungsbeginn schon vorhanden. Bei Verwendung empfindlicher Bestimmungsmethoden bestätigt der Anti-HBc-Nachweis zu diesem Zeitpunkt sogar bis auf wenige Ausnahmen eine frische Infektion. Der Nachweis einer akuten Hepatitis-B-Infektion gelingt jedoch nicht mit Hilfe einer einmaligen Anti-HBc-Bestimmung ohne die HBsAg-Bestimmung.
Da Anti-HBc im Serum länger persistiert als Anti-HBs und Anti-HBe, gilt es als derzeit bester Marker für Durchseuchungsstudien (20).
Anti-HBc findet man im Serum in den Immunglobulinklassen IgG, IgA und IgM. In der Frühphase einer HBV-Infektion stellt Anti-HBc-IgM den Hauptanteil der Antikörper und ist etwa 6-9 Monate nachweisbar. Bei chronischen Verlaufsformen der Hepatitis-B ist durch eine kontinuierliche Stimulation des Immunsystems durch HBcAg in einigen Fällen Anti-HBc-IgM auch über Jahre nachweisbar. Daher ist zur Unterscheidung zwischen akuter Infektion und chronischer Verlaufsform der Hepatitis-B die Anti-HBc-IgM-Bestimmung wichtig. Die akute Hepatitis-B zeigt in ca. 70% der Fälle einen Anti-HBc-IgM-Titer $\geq 10^{-4}$, während sich bei einem chronischen Verlauf ein Anti-HBc-IgM-Titer $\leq 10^{-3}$ findet. In der Regel ist Anti-HBc der IgM-Klasse bei einer chronischen Hepatitis nicht nachweisbar (54).
Anti-HBc-IgG tritt im Vergleich zu Anti-HBc-IgM fast gleichzeitig auf und persistiert über Jahre oder gar lebenslang.
Anti-HBc-IgA tritt wie Anti-HBc-IgM in der Frühphase einer Infektion auf; es hat jedoch nicht die Bedeutung erlangt, die dem Anti-HBc-IgM zukommt.

Fragestellung und Zielsetzung

Eine Vielfalt an Tests zu den bekannten Hepatitis-B-Markern ist käuflich zu erwerben. Sie wurden zum überwiegenden Teil in Radioimmunoassay-Technik (RIA) oder in Enzymimmunoassay-Technik (EIA) entwickelt. Die Vorteile, die die EIA-Technik gegenüber der RIA-Technik bietet, bestehen darin, daß die Umwelt nicht mit radioaktiven Substanzen belastet wird und eine Gefährdung des Laborpersonals durch jahrelangen Umgang mit Isotopen entfällt. Außerdem sind keine teuren Zählsysteme, deren Betreiben eine Umgangsgenehmigung erfordert, zur Auswertung eines Tests erforderlich. Sie könnten sogar mit bloßem Auge beurteilt werden. Zur objektiven Messung reicht ein Photometer aus.

Die gebräuchlichen kommerziellen Tests decken jedoch in der Hepatitis-Diagnostik nicht alle Infektionsfälle auf oder lassen mehrere pathogenetische Möglichkeiten zu. Die Bestimmung des IgM-Anteils des Anti-HBc erlaubt erst eine exakte Differentialdiagnose:

- bei akuter Virushepatitis mit positivem Anti-HBc-Befund ist HBsAg zum Untersuchungszeitpunkt in 5-10% der Fälle schon nicht mehr nachweisbar. Eine Unterscheidung zwischen akuter Hepatitis-B und akuter Hepatitis-non-A-non-B wird nur durch Bestimmung des Anti-HBc-IgM ermöglicht (sogenanntes "diagnostisches Fenster" (69)).
- bei Trägern des HBsAg ist eine Unterscheidung zwischen akutem Schub einer chronischen Hepatitis-B und einer Hepatitis-non-A-non-B nur anhand des Anti-HBc-IgM-Anteils möglich.

Außerdem ermöglicht die Untersuchung des Anti-HBc-IgM insgesamt eine Bestätigung akuter Hepatitis-B-Fälle.

In dieser Arbeit sollen in umweltfreundlicher Enzymimmunoassay-Technik Tests zur Bestimmung des HBcAg und seiner Antikörper entwickelt werden. Besonderes Gewicht erhält dabei der Anti-HBc-IgM-Nachweis.

Probleme bei der Durchführung der Untersuchungen

Da es zur Bestimmung des HBcAg keinen käuflichen Test gibt, gestaltete sich die Präparation des HBcAg aus Lebermaterial als schwierig, weil es nicht frei im Serum vorkommt und die Bestimmung des HBcAg in der Routinediagnostik nicht erforderlich ist. Außerdem wurde hier ein Leberhomogenat untersucht, während die kommerziellen Tests nur für Serum und Plasma entwickelt wurden.
Die verwendeten CORAB^{TM}- und ABBOTT-HBe^{TM}-Tests werden in Bezug auf verwendete Materialien und Aussagemöglichkeiten genau beschrieben, da die Ergebnisse, die beide Tests lieferten, anfangs schwierig zu interpretieren waren. Der Nachweis des HBcAg gelang erst durch zusätzliche Versuche. Die Probleme bei der Interpretation entstanden unter anderem dadurch, daß in beiden erwähnten Tests das Konjugat beide Antikörper mit der Spezifität Anti-HBc und Anti-HBe enthielt. Beide Reagenzien lagen somit als Anti-HBe-J^{125}/Anti-HBc-J^{125}-Gemisch vor (Vgl. Kreuzreaktion des CORAB^{TM}- und des ABBOTT-HBe^{TM}-Tests und Diskussion).

I. Entwicklung eines Enzymimmunoassays zur Bestimmung von Hepatitis-B-core-Antigen

Einführung

1971 beschrieben Almeida et al. das HBcAg im Viruskern (1). Da HBcAg in freier Form im Serum nicht vorkommt, galt das Hauptinteresse von jeher dem korrespondierenden Antikörper Anti-HBc, den man im Serum nachweisen kann. Wurde etwa zur Bestimmung von Anti-HBc einmal HBcAg benötigt, so gewann man es in den meisten Fällen aus Lebermaterial infizierter Schimpansen (34) oder verstorbener Menschen (10). Seltener wurde das Antigen aus Dane-Partikel-haltigem Serum durch Detergentienbehandlung und Zentrifugation präpariert (41, 61, 18). In allen Fällen bereitete es Schwierigkeiten, genügend HBcAg zu präparieren.
In dieser Arbeit wurde versucht, durch Modifikation der von Cohen und Cossart (10) beschriebenen Präparationsmethode aus menschlicher Leber HBcAg zu extrahieren und die Ausbeute zu erhöhen. Da es keinen kommerziellen Test zur Bestimmung von HBcAg gibt, mußte auf die Tests zurückgegriffen werden, die zur Verfügung standen, d. h. die Radioimmunoassays der Firma Abbott Laboratories (Diagnostics Division, North Chicago, USA), CORAB^{TM}-, ABBOTT-HBe^{TM}-, AUSRIA^{R}II-125-, AUSAB^{R}- und HAVAB^{TM}-Test.
Die Enzymimmunoassay-Technik, in der dieser Test erstellt wurde, ist vom Prinzip her dem Radioimmunoassay ähnlich. Während beim RIA ein radioaktives Isotop verwendet wird, benutzt man beim EIA ein Enzym zur Herstellung des Konjugates. Die Sensitivität des EIA entspricht der des RIA (13). 1971 beschrieben Engvall et al. sowie van Weemen et al. einen Test zur Bestimmung von Immunglobulin G mit Hilfe der ELISA-Technik (ELISA = Enzyme-linked-immunosorbent-assay; Synonym für EIA) (15, 65). 1980 entwickelte Duermeyer Methoden zum Nachweis von Hepatitis-A-Virus und dessen Antikörpern in der EIA-Technik (13).

Testprinzip des EIA-HBcAg

Anti-HBc HBcAg Anti-HBc (enzymmarkiertes Konjugat) OPD+UP (Substrat)

An Testplatten adsorbiertes Anti-HBc ermöglicht eine spezifische Bindung des in der Probe befindlichen HBcAg. Im nächsten Schritt wird ein Konjugat zugegeben, bei dem Meerrettichperoxidase (HRPO = horseradish-peroxidase) an Anti-HBc gebunden wurde. Anti-HBc-HRPO bindet sich an HBcAg. Ein farbloses Substrat zeigt durch einen Umschlag seiner Farbe die Anwesenheit des enzymmarkierten Anti-HBc an. Im Photometer wird bei 492 nm die Absorption der Probe gemessen, die ein Maß für ihren HBcAg-Gehalt ist.

Materialien und Methoden

Festphase

Es wurden Mikrotiterplatten der Firma Cooke aus zerschneidbarem PVC mit 8x12 Vertiefungen für den Testansatz benutzt, um Anti-HBc zu adsorbieren.

Anti-HBc

Für die Adsorption des Anti-HBc an die Wände der Mikrotiterplatten stand in ausreichender Menge das Serum eines HBeAg-positiven Patienten zur Verfügung, das noch in einer Verdünnung von 1:30000 in NaCl im CORAB^{TM}-Test positiv reagierte. Um das Serum von Bestandteilen zu reinigen, die beim Test interferieren und die Ergebnisse beeinträchtigen könnten, wurde es einer 20%igen Natriumsulfatfällung unterzogen. Die gewonnene Suspension wurde 20 Minuten lang bei 4500 Umdrehungen pro Minute (Upm) zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und in einer Phosphatpufferlösung 0,005 M, pH 8,0 über Nacht dialysiert. Das Dialysat wurde anschließend nochmals für 20 Minuten bei 4500 Upm zentrifugiert und der Überstand dann auf HBsAg, Anti-HBs, HBeAg, Anti-HBe und Anti-HBc in einer 1:10 Verdünnung in NaCl im RIA der Firma Abbott untersucht.

HBcAg

Präparation

Zur Verfügung standen drei menschliche Lebern von Patienten, die kurz vor ihrem Tod noch HBsAg-positiv waren. Von den drei mit A, B und C bezeichneten Lebern wurden jeweils sechs Gewebeproben von 2 g Gewicht entnommen. Nach Zugabe von 2 ml Aqua dest. wurden die Proben im Wasserbad 10 Minuten auf unterschiedliche Temperaturen erhitzt, die aus der folgenden Tabelle ersichtlich sind:

Probe:	P_1	P_2	P_3	P_4	P_5	P_6
Temp.:	65 °C	70 °C	75 °C	80 °C	85 °C	95 °C

In einer zweiten Aufarbeitung der Leber C (Leber C/2) wurden sieben Gewebeproben entnommen, die auf nachstehende Temperaturen erhitzt wurden:

Probe:	P_0	P_1	P_2	P_3	P_4	P_5	P_6
Temp.:	nicht erhitzt	65 °C	70 °C	75 °C	80 °C	85 °C	95 °C

Im Anschluß an diese Behandlung wurden die Leberproben bei -30 °C eingefroren und mehrfach wieder aufgetaut.
Danach wurden sie im Mörser unter Zugabe von 3 ml Aqua dest. zerkleinert und die Suspension 5 Minuten bei 2500 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und als Überstand 1 der Proben P_1-P_6 und als Überstand 1 der Proben P_0-P_6 (Leber C/2) auf seinen Gehalt an HBsAg, HBeAg und Anti-HBc untersucht.

Anti-HBc-Bestimmung der Leberproben im CORAB™-Test (73)

Prinzip: Der CORAB™-Test ist ein kompetitiver Radioimmunoassay, bei dem nicht-radioaktives Anti-HBc aus der Probe mit einer konstanten Menge an radioaktiv markiertem Anti-HBc-J^{125} um die Bindungsstellen des auf der Oberfläche von Kunststoffkugeln adsorbierten HBcAg konkurriert. Der Anteil des gebundenen, radioaktiven Anti-HBc verhält sich entsprechend umgekehrt proportional zur Anti-HBc-Konzentration in der untersuchten Probe. Die Kugeln werden nach einer bestimmten Inkubationszeit gewaschen. In einem Szintillationszähler wird das gebundene radioaktive Anti-HBc gemessen. Mit Einschränkungen gilt: je höher die gemessene Impulsrate, desto niedriger ist der Anti-HBc-Gehalt der Probe. Die gemessenen Impulsraten werden mit einem Grenzwert verglichen, der sich aus dem Mittelwert der negativen Kontrollen plus dem Mittelwert der positiven Kontrollen, dividiert durch 2, errechnet. Liegt die gemessene Impulsrate der Probe wiederholt unter dem errechneten Grenzwert, so wird die Probe als Anti-HBc-reaktiv angesehen. Proben, deren Impulsraten über dem Grenzwert liegen, gelten als Anti-HBc-negativ.

Verwendete Reagenzien:
Negative Kontrolle CORAB^{TM}: rekalzifiziertes Humanplasma, negativ für Anti-HBc und HBsAg. Konservierungsmittel: 0,1% Natriumazid.
Positive Kontrolle CORAB^{TM}: rekalzifiziertes Humanplasma, positiv für Anti-HBc, negativ für HBsAg. Konservierungsmittel: 0,1% Natriumazid.
J^{125}-Antikörper gegen HBcAg (human) in 0,05 M TRIS - 0,04 M EDTA-Puffer, der 50% fötales Kälberserum und 2% rekalzifiziertes Humanplasma enthält. Radioaktivität: maximal 7,7 µCi/ml (285 kBq/ml). Konservierungsmittel: 0,1% Natriumazid.
Mit HBcAg (human) beschichtete Polystyrolkugeln.

HBsAg-Bestimmung der Leberproben im AUSRIA^{R}-II-125-Test (72)

Prinzip: Polystyrolkugeln, die mit Meerschweinchen-Antikörpern gegen HBsAg beschichtet sind, werden mit Patientenserum oder Plasma zusammen inkubiert. Enthält die untersuchte Probe HBsAg, so bindet sich dieses an die Antikörper der Kugeln. In einer zweiten Inkubation werden mit J^{125}-markierte Antikörper gegen HBsAg zu der Kugel gegeben, die sich an das HBsAg anlagern und ein "Antikörper-Antigen-Antikörper-Sandwich" bilden.
Die in einem Szintillationszähler gemessenen Impulsraten sind innerhalb bestimmter Grenzen umso höher, je mehr Antigen die Probe enthält. Von den in der Testanleitung angegebenen Verfahren wurde Verfahren B gewählt. Der Grenzwert berechnet sich aus dem Mittelwert der Impulsraten der negativen Kontrollproben multipliziert mit dem Faktor 2,1. Ist die Impulsrate der untersuchten Probe höher als der errechnete Grenzwert, so gilt die Probe als HBsAg-reaktiv.
Verwendete Reagenzien:
Polystyrolkugeln, die mit Antikörpern (Meerschweinchen) gegen HBsAg beschichtet sind.
J^{125}-Antikörper (human) gegen HBsAg. Radioaktivität: maximal 0,74 µCi/ml (28 kBq/ml). Konservierungsmittel: 0,1% Natriumazid.

Negative Kontrolle: rekalzifiziertes Humanplasma (nicht reaktiv für HBsAg und Anti-HBs). Konservierungsmittel: 0,1% Natriumazid.
Positive Kontrolle: rekalzifiziertes Humanplasma (positiv für HBsAg). Konservierungsmittel: 0,1% Natriumazid.

HBeAg-Bestimmung der Leberproben im ABBOTT-HBe^{TM}-Test (70)

Prinzip: Der HBeAg-Gehalt der Probe wird in diesem Test, der nach dem "Sandwich-Prinzip" aufgebaut ist, in Form eines Feststoff-Radioimmunoassays bestimmt. Die Polystyrolkugeln sind mit humanem Anti-HBe beschichtet, an das sich das HBeAg der untersuchten Probe anlagert. In einer zweiten Inkubation mit J^{125}-markierten Antikörpern verbinden sich diese mit dem auf der Kugel angelagerten HBeAg der reaktiven Proben zu einem "Antikörper-Antigen-Antikörper-Sandwich". Die im Szintillationszähler gemessenen Impulsraten verhalten sich in Grenzen proportional zum HBeAg-Gehalt der untersuchten Probe. Liegt die Impulsrate der Probe wiederholt höher als ein Grenzwert, der sich aus dem 2,1-fachen Wert der mittleren Impulsrate der negativen Kontrollen errechnet, so gilt die Probe als HBeAg-positiv. Liegt die Impulsrate unterhalb des Grenzwertes, so gilt die Probe als HBeAg-negativ.
Verwendete Reagenzien:
Mit Antikörpern (human) gegen HBeAg-beschichtete Kugeln.
J^{125}-Antikörper (human) gegen HBeAg in 0,01 M phosphatgepufferter Kochsalzlösung mit Proteinstabilisatoren. Radioaktivität: maximal 3,8 µCi/ml (141 kBq/ml). Konservierungsmittel: 0,1% Natriumazid.
Negative Kontrolle: rekalzifiziertes Humanplasma, nicht reaktiv für HBeAg, Anti-HBe und HBsAg. Konservierungsmittel: 0,1% Natriumazid.
Positive Kontrolle: rekalzifiziertes Humanplasma, reaktiv für HBeAg und HBsAg. Mindesttiter 1:2. Konservierungsmittel: 0,1% Natriumazid.

Quantifizierung des HBcAg der Proben

Überstände von Leberproben, die im ABBOTT-HBe^{TM}-Test HBcAg-positiv reagierten, wurden in einer Verdünnungsreihe untersucht. Sie wurde in Aqua dest. von V_0-V_7 hergestellt. Der Probenanteil einer Verdünnungsstufe geht aus folgender Tabelle hervor:

Verdünnung:	V_0	V_1	V_2	V_3	V_4	V_5	V_6	V_7
Probe:	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128

Der HBcAg-Gehalt der Verdünnungsreihen wurde wiederum im ABBOTT-HBe^{TM}-Test bestimmt.

Quantifizierung des HBcAg der Leber C

Die Ergiebigkeit der Leberproben an HBcAg wurde durch wiederholte Resuspension der Probenrückstände in Aqua dest. und durch anschließende Untersuchung der Überstände auf HBcAg untersucht. Insgesamt wurden die Leberproben achtmal resuspendiert.
Da HBcAg anschließend in größerer Menge für die Versuche benötigt wurde, wurden die Überstände der Proben P_0-P_5 der Leber C/2 durchmischt und auf ihren neuen HBcAg-Gehalt untersucht.

Kreuzreaktion des CORAB^{TM}- und ABBOTT-HBe^{TM}-Tests

Die Polystyrolkugeln des CORAB^{TM}-Tests, auf deren Oberfläche HBcAg adsorbiert ist, wurden zum einen mit Anti-HBe-J^{125}- und zum anderen mit Anti-HBc-J^{125}-Reagenz inkubiert, gewaschen und die Impulsraten im Szintillationszähler gemessen. Die Kugeln des ABBOTT-HBe^{TM}-Tests, die mit Anti-HBe beschichtet sind, wurden mit positiver Kontrolle des gleichen Tests für HBeAg inkubiert. Die positive Kontrolle enthält rekalzifiziertes Humanplasma, reaktiv für HBeAg und HBsAg. Anschließend wurden die Kugeln gewaschen und mit Anti-HBe-J^{125}- oder Anti-HBc-J^{125}-Reagenz inkubiert, wiederum gewaschen und die Impulsraten im Szintillationszähler gemessen.

Neutralisation des HBcAg

Die Neutralisation des HBcAg wurde mit Hilfe des ABBOTT--HBe™-Radioimmunoassay durchgeführt. 100 µl Probe wurde in einer Verdünnungsreihe V_1-V_7 mit je 100 µl des Anti-HBc--positiven Serums des Patienten K., mit dem auch die Mikrotiterplatten beschichtet wurden, vorinkubiert. Anschließend wurden die Anti-HBe-beschichteten Kugeln zugegeben und diese mit Anti-HBe-J^{125}-Reagenz inkubiert, gewaschen und gemessen.

Konjugat

Zur Erstellung des Konjugates wurde der gleiche Antikörper gegen HBcAg benutzt, der schon zur Adsorption an die Wände der Mikrotiterplatten verwendet wurde. Die Aufbereitung des Anti-HBc erfolgte wiederum mit Natriumsulfatfällung, Dialyse und zweimaliger Zentrifugation. Als Enzym zur Markierung des Antikörpers gegen HBcAg wurde Meerrettichperoxidase (HRPO = horse-radish peroxidase) gewählt. Die Enzymmarkierung des Anti-HBc erfolgte nach der Beschreibung von P. Nakane und A. Kawaoi (44).
Prinzip: Der Kohlenhydratanteil der Meerrettichperoxidase, deren freie Aminogruppen durch 1-Fluor-2,4-Dinitrobenzol in ihrer Aktivität blockiert sind, wird durch Natriumperjodat oxydiert und bildet Aldehydgruppen. Die Aldehydgruppen binden sich an die Aminogruppen der Proteine (Immunglobuline), ohne daß das Immunglobulin seine immunologische und die Peroxidase ihre enzymatische Aktivität verlieren. Etwa 70% der zugegebenen Meerrettichperoxidase bindet sich an das Immunglobulin G und etwa 99% des verwendeten Immunglobulin G wird an Meerrettichperoxidase gebunden.
Markierungsanleitung:
Das Konjugat wurde nach folgender Arbeitsvorschrift hergestellt (44):
1) 5 mg Meerrettichperoxidase werden in 1,0 ml frisch angesetztem 0,3 M Natriumbikarbonat bei pH 8,1 (HRPO, RZ 3,0 Firma Boehringer, Mannheim) gelöst.

2) Zur oben beschriebenen Lösung werden 0,1 ml 1% 1-Fluor-2,4--Dinitrobenzol (FDNB) in absolutem Äthanol gegeben. 1 Stunde lang bei Raumtemperatur vorsichtig mischen.
3) Zu dieser Lösung werden 1,0 ml 0.04-0.08 M $NaJO_4$ (Natriumperjodat) in destilliertem Wasser hinzugefügt. 30 Minuten lang bei Raumtemperatur vorsichtig mischen.
4) Zu dieser Lösung werden 1,0 ml 0,16 M Äthylen-Glykol in destilliertem Wasser gegeben. 1 Stunde lang bei Raumtemperatur vorsichtig mischen.
5) Die Lösung wird gegen 3x1 Liter 0,01 M Natrium-Karbonat--Puffer, pH 9,5 bei 4 ^{o}C dialysiert.
6) 5 mg IgG werden zu einer 3 ml HRPO-Aldehydlösung gegeben. Vorsichtig für 2-3 Stunden bei Raumtemperatur mischen. Das IgG kann vor dem Mischen in 1 ml Karbonat-Puffer gelöst werden oder in Puderform salzfrei zugegeben werden.
(Den angegebenen 5 mg IgG entsprechen 1,5 ml des dialysierten Anti-HBc-positiven Patientenserums.)
7) 5 mg $NaBH_4$ (Natriumborhydrid) werden hinzugefügt. Die Lösung wird bei 4 ^{o}C 3 Stunden oder über Nacht stehengelassen.
8) Bei 4 ^{o}C gegen Phosphatpufferlösung, 0,05 M, pH 7,2, dialysieren (44).

EIA-HBcAg

Die unten beschriebene Testdurchführung ist das Ergebnis zahlreicher Vorversuche, in denen die einzelnen Bedingungen des HBcAg-Nachweises untersucht wurden. Die Auswertung dieser Vorversuche erfolgte nicht mit dem enzymmarkierten Anti-HBc eigener Herstellung, sondern mit Anti-HBe-J^{125}-Reagenz aus dem ABBOTT-HBe^{TM}-Testkit, das sich in der Laborarbeit bewährt hat und bei allen EIA-HBcAg-Versuchsreihen als Kontrolle des enzymmarkierten Konjugates mitgeführt wurde.

EIA-HBcAg Testdurchführung

1) Beschichtung einer Mikrotiterplatte der Firma Cooke mit je 100 μl Anti-HBc, 1:2000 verdünnt in Karbonat-Puffer pH 9,6, 0,1 M. Inkubation über Nacht bei Zimmertemperatur.

2) Mikrotiterplatte fünfmal waschen mit 200 µl tweenhaltiger Waschlösung der Firma Organon Teknika, Oss, Niederlande.
3) Zugabe von je 100 µl Probe mit Zusatz von 1% Tween 20 (Firma Merck, BR-Deutschland). Inkubation bei Zimmertemperatur über Nacht.
4) Waschen der Mikrotiterplatte wie unter Punkt 2 beschrieben.
5) Zugabe von 100 µl Anti-HBc-HRPO, 1:400 verdünnt in Karbonatpuffer, pH 9,6, 0,1 M, mit Zusatz von 1% Tween 20 und 20% negativem Humanserum (negative Kontrolle des AUSRIA^{R}II-125 der Firma ABBOTT). Inkubation drei Stunden bei Zimmertemperatur.
6) Waschen der Mikrotiterplatte wie unter Punkt 2 beschrieben.
7) Zugabe von 100 µl des Substrates OPD (o-Phenylendiamin) und UP (Ureaperoxid) der Firma Organon. Inkubation 20 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit (s. Anmerkung).
8) Zugabe von 100 µl 3N H_2SO_4 stoppt die Enzymreaktion.
9) Photometrische Messung der Extinktion der Proben bei 492 nm.

Anmerkung: Das Substrat der Firma Organon wird wie folgt hergestellt:

a) 1 Tablette OPD (enthält 12 mg OPD pro Tablette) in 30 ml Aqua dest. auflösen.
b) 1 Tablette UP (enthält 130 mg UP pro Tablette) in 7,5 ml Aqua dest. auflösen.
c) 0,5 ml der UP-Lösung zu 30 ml der OPD-Lösung geben.

Auswertung

Die Proben werden bei 492 nm gegen einen Leerwert gemessen, der nur mit Substrat inkubiert und mit 100 µl 3N H_2SO_4 in der Enzymreaktion gestoppt wurde.

Positive und negative Kontrolle

Ein positives und negatives standardisiertes Testserum für HBcAg gibt es nicht. Daher mußten eigene Kontrollen entwickelt werden.

Positive Kontrolle: Als positive Kontrolle für HBcAg gelten die im RIA als positiv gewerteten unverdünnten Proben P_1-P_4 der Leber C.

Negative Kontrolle: In der 6. und 7. waagerechten Reihe wurden Proben mitgeführt, die vom Testansatz her unvollständig sind. Die 6. Reihe wurde nur mit Anti-HBc, 1:2000 verdünnt, ohne Zugabe einer HBcAg-haltigen Probe inkubiert. Die 7. Reihe wurde ohne Vorinkubation nur mit HBcAg beschichtet (unter Zusatz von 1% Tween 20) und ausgewertet. Als negative Kontrolle des EIA-HBcAg wurde auch die positive Kontrolle für HBeAg des ABBOTT-HBe^{TM}-Tests untersucht. Sie enthält HBeAg und HBsAg in rekalzifiziertem Humanplasma, Mindesttiter 1:2. Sie enthält kein HBcAg.

Grenzwert: Proben, deren Extinktion über dem 2,2-fachen des Mittelwertes der beiden negativen Kontrollen liegt, gelten im EIA-HBcAg als HBcAg-positiv. Findet sich eine Probe im Grenzbereich, so ist eine Wiederholung des Tests empfehlenswert.

Ergebnisse

Anti-HBc

Die Untersuchung des Patientenserums, aus dem das Anti-HBc zur Beschichtung der Mikrotiterplatten gewonnen wurde, erbrachte die in Tabelle I.1 aufgeführten Ergebnisse:

Patienten-serum K.	HBsAg	Anti-HBs	HBeAg	Anti-HBe	Anti-HBc
1. Serum K. unverdünnt	+	-	+	-	+
2. Serum K. 1:30000 verdünnt	+	-	-	-	(+)
3. Dialysat unverdünnt	-	-	-	-	+
4. Dialysat 1:10 verd.	-	-	-	-	+
5. resusp. Fällungs-rückstand	-	-	-	-	+

Tabelle I.1: Untersuchung des Patientenserums K. im RIA

Dieses hochpositive Serum für Anti-HBc enthält außerdem HBsAg und HBeAg, das nach Fällung, Dialyse und Zentrifugation nicht mehr nachweisbar ist. Solange ein Serum HBeAg enthält, ist der korrespondierende Antikörper, Anti-HBe, nicht nachweisbar, da er das Antigen neutralisieren würde. Somit liegt hier ein Serum vor, das monospezifisch Anti-HBc enthält und kein Anti-HBc-/Anti-HBe-Gemisch.

Da durch die Fällung des Serums nicht nur ein Verlust an HBsAg und HBeAg, sondern auch an Anti-HBc zu erwarten ist, wurde in einer Verdünnungsreihe in Karbonatpuffer, pH 9,6, 0,1 M, erneut geprüft, bis zu welcher Verdünnungsstufe das Serum Anti-HBc-positiv war.

	Anti-HBc-Verdünnungsstufe	Impulsrate (cpm)
1	1:1	198
2	1:10	257
3	1:100	477
4	1:1000	1029
5	1:10000	1862
6	1:20	303
7	1:40	549
8	1:80	418
9	1:160	523
10	1:320	528
11	1:640	841
12	1:1280	1061
13	1:2560	1791
14	1:5120	1478
15	1:10240	2049
16	K_{pos}	118
17	K_{pos}	98
18	K_{pos}	106
19	K_{neg}	1566
20	K_{neg}	1621
	Grenzwert	850

Tabelle I.2: Untersuchung des Anti-HBc-Gehaltes des Patientenserums K. in einer Verdünnungsreihe nach Fällung mit Na_2SO_4

Bis zu einer Verdünnung von 1:640 reagierte das Serum auch nach der Fällungsbehandlung Anti-HBc-positiv.

HBcAg

Durch abgestufte Erhitzung der Leberproben sollte untersucht werden, inwieweit sich die HBcAg-Ausbeute aus den Zellkernen der Leberzellen verändert. Zusätzlich sollte die mögliche Infektiosität des Leberhomogenates herabgesetzt werden.

Untersuchung des Leberhomogenates im CORAB™-Test auf Anti-HBc:

Ein positiver Ausfall dieses Tests auf Antikörper gegen HBcAg läßt wegen der Struktur des Radioimmunoassays keine eindeutige Aussage zu. Die positive Reaktion kann sowohl durch HBcAg als auch durch Anti-HBc verursacht werden.

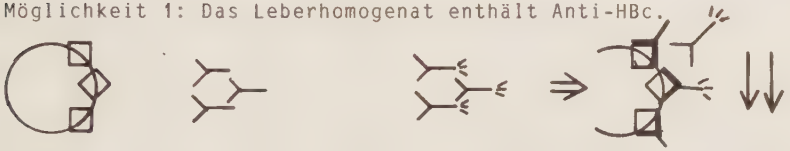
Drei Ergebniskonstellationen sind möglich:
Zeichenerklärung:

Kunststoffkugel, auf deren Oberfläche HBcAg adsorbiert ist.

Anti-HBc

radioaktiv markiertes Anti-HBc-/Anti-HBe-J^{125}

Möglichkeit 1: Das Leberhomogenat enthält Anti-HBc.

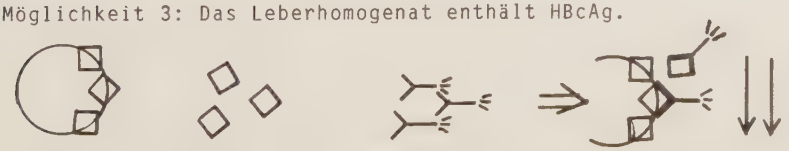


HBcAg — Anti-HBc positives Leberhomogenat — Anti-HBc-/Anti-HBe-J^{125} — niedrige Impulsraten im Szintillationsz.

Möglichkeit 2: Das Leberhomogenat enthält weder HBcAg noch Anti-HBc.

HBcAg — negatives Leberhomogenat — Anti-HBc-/Anti-HBe-J^{125} — hohe Impulsraten im Szintillationsz.

Möglichkeit 3: Das Leberhomogenat enthält HBcAg.



HBcAg — HBcAg positives Leberhomogenat — Anti-HBc-/Anti-HBe-J^{125} — niedrige Impulsraten im Szintillationsz.

Diese dritte Möglichkeit ergibt sich aus der Tatsache, daß das Leberhomogenat im Gegensatz zu menschlichem Serum auch HBcAg enthalten kann. Es bindet die radioaktiv markierten Antikörper gegen HBcAg im Test ab, bevor sie sich an das HBcAg der Kunststoffkugel anlagern können. Die nicht an die Kunststoffkugel adsorbierten Antigen-Antikörper-Komplexe werden jedoch beim Waschvorgang ausgewaschen, so daß eine erniedrigte Impulsrate im Szintillationszähler zu erwarten ist.

	Probe	Leber A (Impulsrate)	Leber B (Impulsrate)	Leber C (Impulsrate)
1	P_1	1282	1303	1380
2	P_1	1270	1138	1295
3	P_2	1701	1182	1277
4	P_2	1508	1393	1114
5	P_3	3507	1591	1293
6	P_3	3434	1813	1144
7	P_4	4967	2591	1422
8	P_4	6807	2695	1436
9	P_5	7485	4238	3020
10	P_5	6978	4224	2421
11	P_6	8133	4536	4000
12	P_6	7865	4400	3775
13	K_{pos}	170	124	98
14	"	202	146	86
15	"	168	107	120
16	"	254	131	94
17	K_{neg}	8251	4001	1915
18	"	8185	3973	2255
19	"	8914	3228	1961
20	"	9184	3597	1997
	Grenzwert	4415	1913	1065

Tabelle I.3: Bestimmung des Anti-HBc-Gehaltes der Leberproben

Den Erläuterungen des CORAB^{TM}-Tests entsprechend gelten von den Lebern A und B die Proben P_1-P_3 als Anti-HBc-reaktiv. Die Leber C weist keine Anti-HBc-reaktiven Proben auf. Trägt man die Impulsraten der Proben P_1-P_6 der Lebern A, B und C in ein Diagramm ein, so erkennt man mit zunehmendem Erhitzungsgrad der Probe eine Annäherung der Impulsraten an die negativen Kontrollen des Tests.

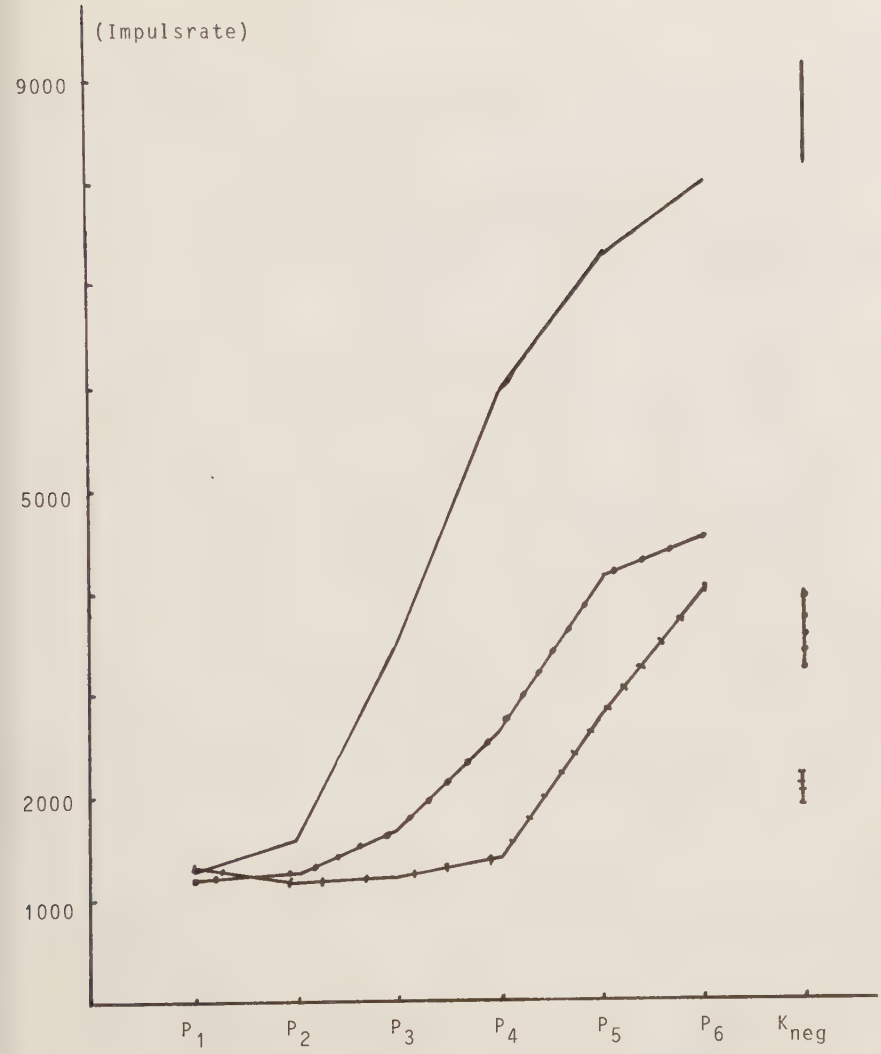


Abbildung 2: Darstellung der Abhängigkeit des Anti-HBc-Gehaltes der Proben vom Erhitzungsgrad

Leber A
Leber B
Leber C

Untersuchung auf HBsAg

Da HBsAg sowohl im menschlichen Blutplasma als auch in der Leber vorkommen kann, ergeben sich bezüglich der Verwendung von Leberhomogenat im Test anstelle von Serum keine zusätzlich denkbaren Ergebniskonstellationen. Möglich sind zwei verschiedene Ergebnisse:

Zeichenerklärung:

Kunststoffkugel, an die Meerschweinchen-Antikörper gegen HBsAg adsorbiert sind

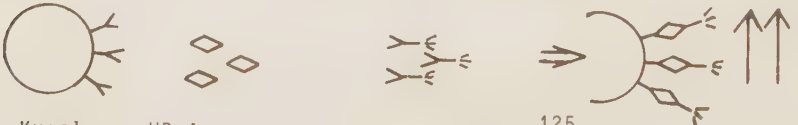
HBsAg im Serum oder Leberhomogenat

radioaktiv markierte Antikörper gegen HBsAg

Möglichkeit 1: Das Leberhomogenat enthält kein HBsAg.

Kugel — HBsAg negatives Leberhomogenat — Anti-HBs-J^{125} — niedrige Impulsraten im Szintillationsz.

Möglichkeit 2: Das Leberhomogenat enthält HBsAg.



Kugel — HBsAg positives Leberhomogenat — Anti-HBs-J^{125} — hohe Impulsraten im Szintillationszähler

Im AUSRIA^{R}II-125 Radioimmunoassay wurden für die drei Lebern nachfolgende Impulsraten im Szintillationszähler gemessen:

	Probe	Leber A (Impulsrate)	Leber B (Impulsrate)	Leber C (Impulsrate)
1	P_1	87	144	1607
2	"	57	165	1682
3	P_2	60	91	378
4	"	53	106	402
5	P_3	235	83	132
6	"	60	104	126
7	P_4	87	113	121
8	"	72	88	105
9	P_5	103	87	114
10	"	75	94	86
11	P_6	86	84	75
12	"	68	75	85
13	K_{pos}	2836	3264	2827
14	"	3073	3608	2515
15	"	3214	3152	2744
16	"	3028	3470	2911
17	K_{neg}	95	105	124
18	"	85	77	67
19	"	101	92	99
20	"	66	70	85
	Grenzwert	182	181	197

Tabelle I.4: Bestimmung des HBsAg-Gehaltes der Leberproben

Es gelten P_1 und P_2 der Leber C als schwach HBsAg-reaktiv.
Die später wiederholte Aufarbeitung der Leber C (Leber C/2) ergab im AUSRIA^{R}II-125-Test die in Tabelle I.5 aufgeführten Ergebnisse.
Der errechnete Grenzwert von 179 Impulsen pro 30 Sekunden Meßzeit weist die Proben P_1 und P_2 als schwach HBsAg-reaktiv aus. Die Probe P_0, die in dieser Testreihe nicht erhitzt wurde, zeigt eine deutlich positive Reaktion auf HBsAg.

	Probe	Leber C/2 (Impulsrate)
1	P_0	5730
2	"	6612
3	P_1	664
4	"	682
5	P_2	235
6	"	211
7	P_3	149
8	"	123
9	P_4	111
10	"	124
11	P_5	109
12	"	112
13	P_6	104
14	"	108
15	K_{pos}	5639
16	"	4277
17	"	4608
18	K_{neg}	83
19	"	87
20	"	86
	Grenzwert	179

Tabelle I.5: HBsAg-Gehalt der Leber C/2

Der Kurvenverlauf in Abbildung 3 zeigt die graphische Darstellung der gemessenen Impulsraten in Abhängigkeit von dem Erhitzungsgrad der einzelnen Proben.

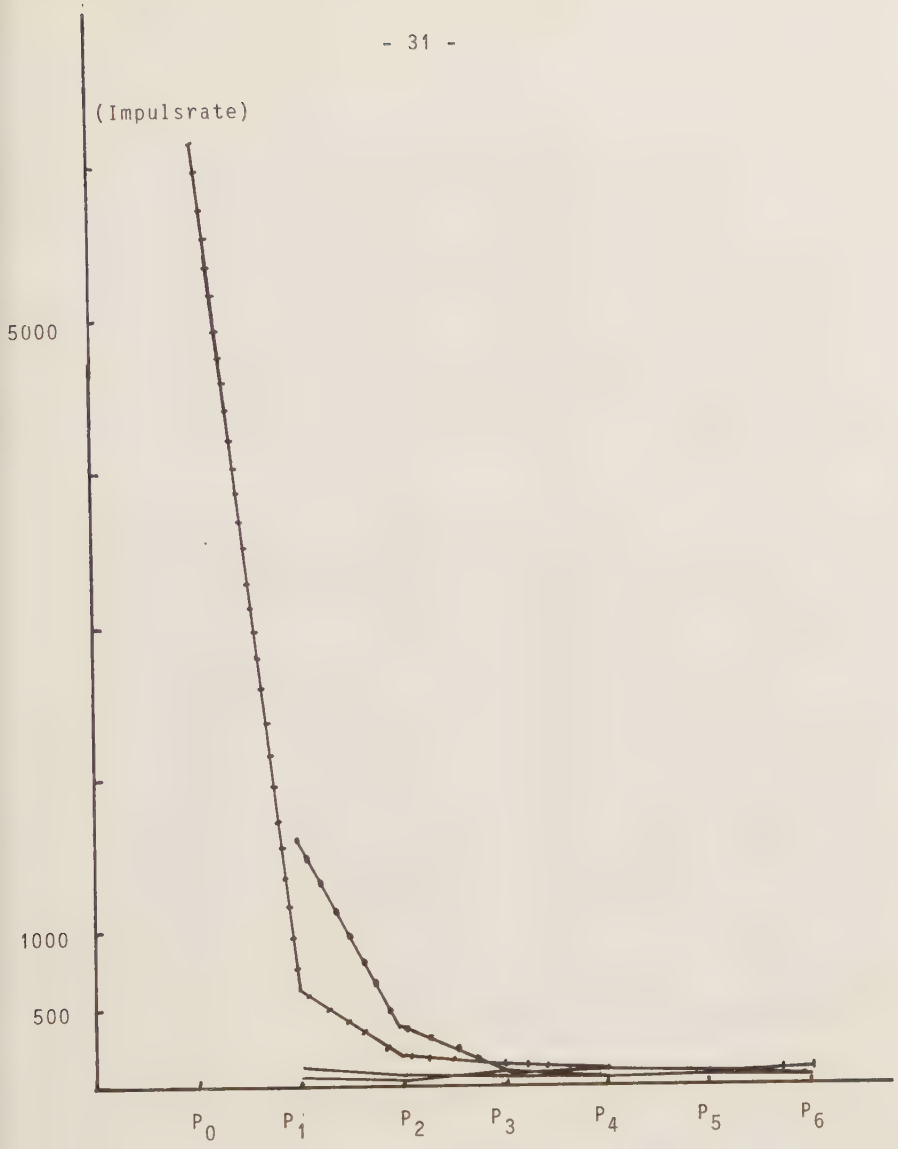


Abbildung 3: Abhängigkeit der Impulsraten der Leberproben im AUSRIA^{R}II-125 vom Erhitzungsgrad

Leber A
Leber B
Leber C
Leber C/2

Untersuchung auf HBeAg

Ebenso wie HBsAg findet sich HBeAg im Blutplasma und in der Leber. Auch die beiden Möglichkeiten für einen positiven oder negativen Ausfall des RIÀ decken sich mit denen, die bei der Untersuchung auf HBsAg beschrieben wurden: enthält das Leberhomogenat kein HBeAg, so ist eine niedrige Impulsrate im Szintillationszähler zu erwarten. Umgekehrt kann mit einer hohen Impulsrate gerechnet werden, wenn das Leberhomogenat HBeAg enthält.

Im ABBOTT-HBe^{TM}-Test wurden folgende Ergebnisse erzielt:

	Probe	Leber A (Impulsrate)	Leber B (Impulsrate)	Leber C (Impulsrate)
1	P_1	120	257	16383
2	"	105	240	11579
3	P_2	108	301	36980
4	"	82	320	40006
5	P_3	184	238	44389
6	"	212	318	39253
7	P_4	206	242	14842
8	"	148	216	17627
9	P_5	193	249	6344
10	"	220	211	15078
11	P_6	193	200	352
12	"	209	225	300
13	K_{pos}	2190	1878	1756
14	"	1656	2788	2354
15	"	2204	2136	2400
16	"	1738	2240	2484
17	K_{neg}	226	201	228
18	"	176	223	213
19	"	207	184	186
20	"	223	166	270
	Grenzwert	437	406	471

Tabelle I.6: Bestimmung des HBeAg-Gehaltes der Leberproben

Die Proben P_1-P_5 der Leber C reagierten im Test stark positiv, P_6 der Leber C und alle Proben der Lebern A und B reagierten im Test nicht.

Die zweite Aufarbeitung der Leber C ergab vergleichbare Ergebnisse, die in Tabelle I.7 aufgeführt sind.

	Probe	Leber C/2 (Impulsrate)
1	P_0	19865
2	"	20806
3	P_1	35057
4	"	36218
5	P_2	19778
6	"	19517
7	P_3	25858
8	"	27891
9	P_4	24875
10	"	24029
11	P_5	14974
12	"	20104
13	P_6	253
14	"	232
15	K_{pos}	2136
16	"	2555
17	"	2235
18	"	2416
19	K_{neg}	169
20	"	142
21	"	182
22	"	191
	Grenzwert	360

Tabelle I.7: Bestimmung des HBeAg-Gehaltes der Leber C/2

Auch hier reagierten die Proben P_0-P_5 stark positiv. Abbildung 4 stellt die Impulsraten in Abhängigkeit vom Erhitzungsgrad der Leberproben dar. Dabei liegen die besten Reaktionen bei mittleren Erhitzungsgraden.

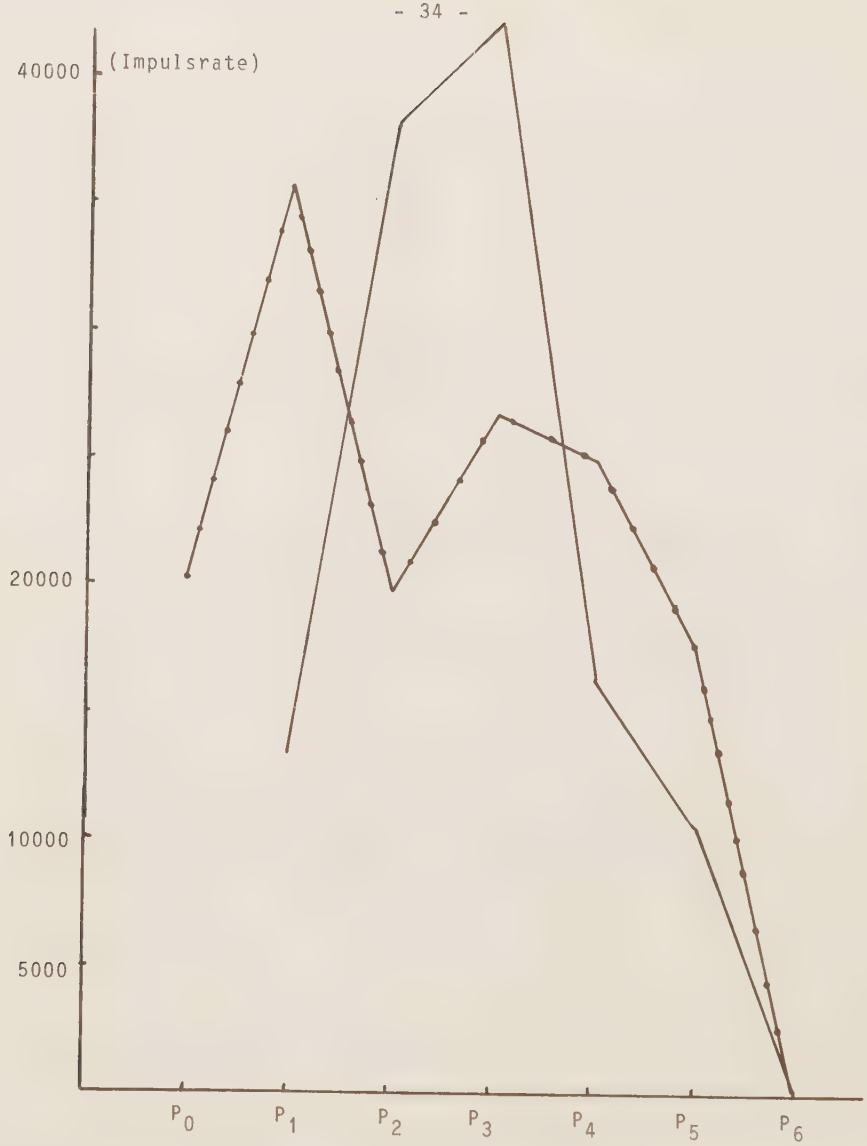


Abbildung 4: Abhängigkeit der Impulsraten im ABBOTT-HBe^{TM}-Test vom Erhitzungsgrad der Proben der Leber C

Leber C
Leber C/2

Quantitative Untersuchung des HBcAg
Von den Proben P_0-P_3 der Leber C/2 wurde eine Verdünnungsreihe in Aqua dest. hergestellt und im ABBOTT-HBe™-Test untersucht.

	Verdünnungsstufe	P_0	P_1	P_2	P_3
1	V_0	17890	31936	23688	53294
2	"	16925	25611	23612	49296
3	V_1	8226	8919	6099	19968
4	"	8087	7692	5844	20265
5	V_2	4690	2117	1750	2747
6	"	4519	1960	2107	2535
7	V_3	2119	1405	1239	1679
8	"	2250	1304	1136	1540
9	V_4	1179	810	758	1161
10	"	1282	815	750	1056
11	V_5	647	454	443	643
12	"	598	491	623	696
13	V_6	460	405	488	495
14	"	452	336	406	588
15	V_7	419	278	329	430
16	"	349	312	357	354
17	K_{pos}	1804	2494	3470	3830
18	"	2196	1807	3557	3025
19	"	2144	2160	3251	3169
20	K_{neg}	146	151	146	166
21	"	151	199	176	189
22	"	129	223	195	191
	Grenzwert	312	420	379	400

Tabelle I.8: Quantitative Untersuchung des HBcAg der Leber C/2 in einer Verdünnungsreihe

In der Auswertung gilt die Verdünnungsreihe der Probe P_0 bis zu V_7 (= 1/128 verdünnt) als positiv, P_1 bis V_5 (= 1/32 verdünnt), P_2 bis V_6 (= 1/64 verdünnt) und P_3 ebenfalls bis V_6 (= 1/64 verdünnt) als positiv.
Eine graphische Darstellung der Verdünnungsreihen zeigt folgende Kurvenverläufe:

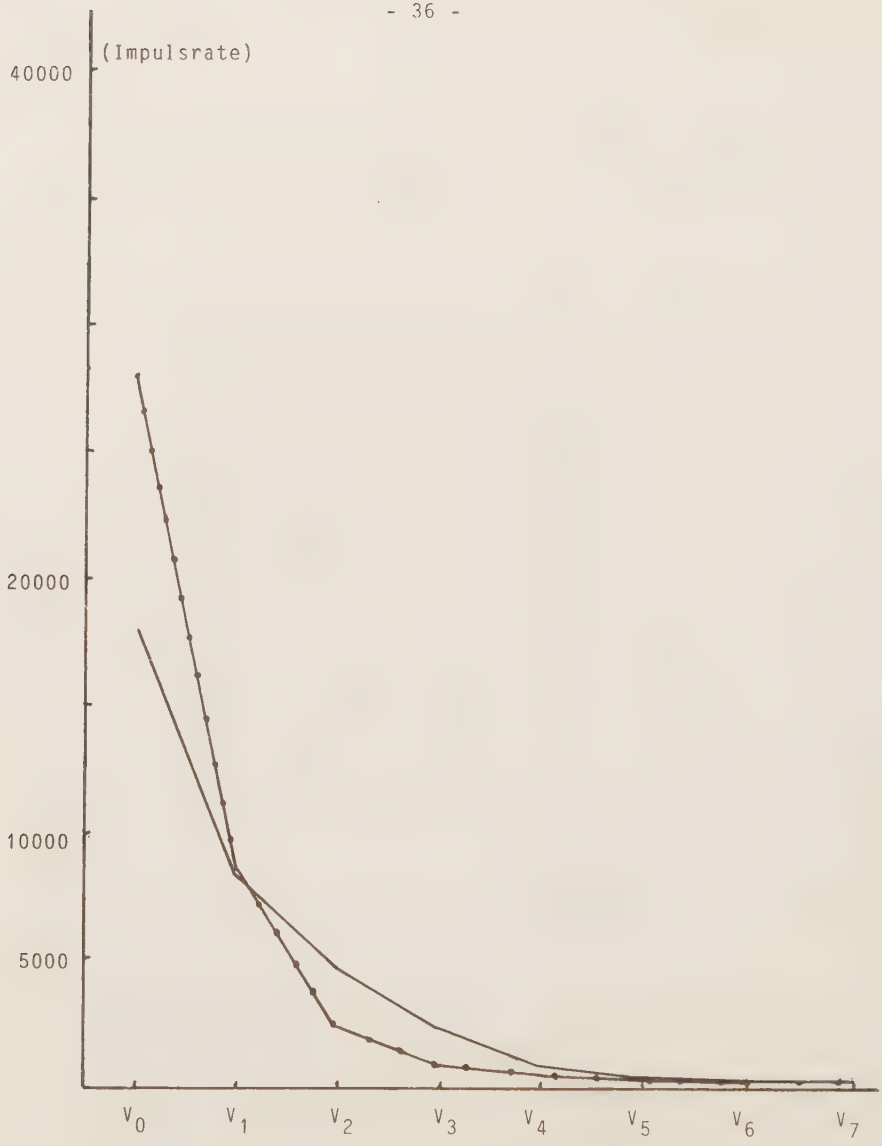


Abbildung 5: Graphische Darstellung der Impulsraten der Proben P_0 und P_1 der Leber C/2 in Abhängigkeit von der Verdünnung

P_0 ——— P_1 ———●———●———

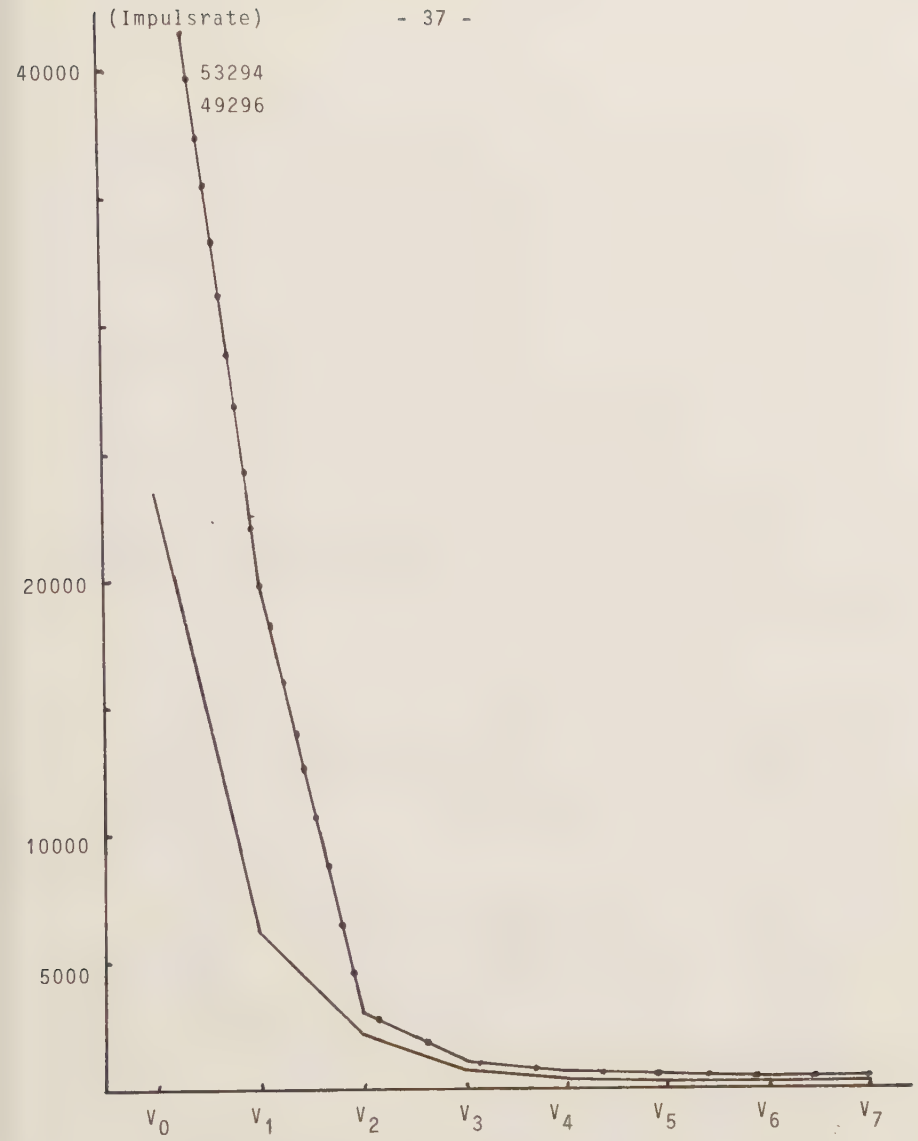


Abbildung 6: Graphische Darstellung der Impulsraten der Proben P_2 und P_3 der Leber C/2 in Abhängigkeit von der Verdünnung

P_2 ——— P_3 ——•——•——

Kreuzreaktion des CORAB^{TM}- und des ABBOTT-HBe^{TM}-Tests

Die positiven Reaktionen der beiden Aufarbeitungen der Leber C wurden bisher mit Hilfe des ABBOTT-HBe^{TM}-Tests nachgewiesen, der zur HBe-Bestimmung entwickelt wurde.
Da stark positive Proben, die Anti-HBe enthalten, immer auch Anti-HBc aufweisen, wurde vermutet, daß die Bestimmungen mit den erwähnten Testkits nicht monospezifisch sind. Auf den Kugeln des HBeAg-Tests und im Konjugat befinden sich Anti-HBe- und Anti-HBc-Moleküle.
Das ist in der Praxis unerheblich, da freies HBcAg nicht vorkommt. Bei der Bestimmung des HBcAg aus der Leber spielt diese Tatsache jedoch eine Rolle.
Daher wurde in diesem Versuch das Konjugat beider Testkits auch im jeweils anderen Test untersucht. Im folgenden Versuch konnte nachgewiesen werden, daß ein Antikörpergemisch von Anti-HBe-J^{125} und Anti-HBc-J^{125} vorliegt.

Versuchsanordnung CORAB^{TM}-Test:

HBcAg

Anti-HBe-J^{125}-Reagenz

3538
4539
3239

gemessene Impulsrate

HBcAg

Anti-HBc-J^{125}-Reagenz

3685
3613
3664

gemessene Impulsrate

Versuchsanordnung ABBOTT-HBe^{TM}-Test:

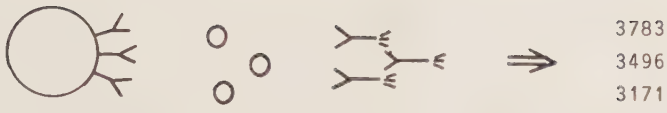
Anti-HBe/Anti-HBc

HBeAg

Anti-HBe-J^{125}-Reagenz

2185
2094
2313

gemessene Impulsrate



Anti-HBe/Anti-HBc | HBeAg | Anti-HBc-J^{125}-Reagenz | gemessene Impulsrate

Bei Benutzung des CORAB^{TM}-Tests liegen die gemessenen Impulsraten für beide radioaktiven Antikörperreagenzien nahezu gleich hoch, was einem Mischungsverhältnis der Antikörper von 1:1 entspricht.
Im ABBOTT-HBe^{TM}-Test liegt die Impulsrate bei Verwendung des Anti-HBc-J^{125}-Reagenz sogar höher als bei Verwendung des Anti-HBe-J^{125}, das eigentlich zum Testkit gehört.

Neutralisation des HBcAg

Der Nachweis, daß es sich bei dem in der Leber C entdeckten Antigen um HBcAg handelt, gelang durch Neutralisation mit dem monospezifischen Antikörper, Anti-HBc, aus dem Serum des Patienten K.

Versuchsanordnung:

Probe (HBcAg) | Anti-HBc monospezif. | Anti-HBe/ Anti-HBc | Anti-HBe/ Anti-HBc-J^{125} | gemessene Impulsrate

Zur Neutralisation des HBcAg wurde der ABBOTT-HBe^{TM}-Test in der oben angegebenen Versuchsanordnung verwendet.

	Probe	(Impulsrate)
1	P_1	188
2	"	190
3	V_1	169
4	"	189
5	V_2	193
6	"	180
7	V_3	173
8	"	180
9	V_4	141
10	"	165
11	V_5	172
12	"	199
13	V_6	178
14	"	162
15	V_7	182
16	"	118
17	K_{pos}	2313
18	"	2560
19	K_{neg}	141
20	"	153

Tabelle I.9: Neutralisation des HBcAg mit monospezifischem Anti-HBc

Die in einer Verdünnungsreihe der Probe P_1 der Leber C gemessenen Impulsraten zeigten von P_1-V_7 der negativen Kontrolle ähnliche Werte. Es handelte sich also bei dem aus der Leber präparierten Antigen um HBcAg.

Resuspendierung der Rückstände der Proben P_1-P_6 der Leber C/2

Die Ausbeute des HBcAg wurde durch mehrmalige Resuspendierung der Probenrückstände bestimmt. Untersucht wurde die zweite Aufarbeitung der Leber C.
In dieser Untersuchungsreihe wurden die Überstände noch nach Proben unterschieden, die auf verschieden hohe Temperaturen erhitzt worden waren. In Tabelle I.10 zeigten die Proben P_1-P_3 die besten positiven Ergebnisse.

Überstand	Probe	Impulsrate (cpm)
$Ü_2$	P_1	2201
	P_2	7434
	P_3	1671
	P_4	1192
$Ü_3$	P_1	3482
	P_2	11933
	P_3	2365
	P_5	589
$Ü_4$	P_1	4641
	P_3	3243
	P_4	519
	P_5	790
	P_6	329
$Ü_5$	P_1	7431
	P_2	12741
	P_4	2457
	P_5	1926
	P_6	630
	K_{pos}	1468
	"	1622
	"	1394
	K_{neg}	107
	"	137
	"	149
	Grenzwert	275

Tabelle I.10: Bestimmung des HBcAg der Proben P_1-P_6 der Überstände $Ü_2$-$Ü_5$

Eine weitere Resuspendierung der Rückstände wurde bis zum Überstand 8 untersucht. Hierbei wurden allerdings die Überstände der Proben P_1-P_5 vorher schon miteinander vermischt.

	Überstand	Impulsrate (cpm)
1	$Ü_4$	2527
2	"	2893
3	"	2703
4	$Ü_5$	5891
5	"	5706
6	"	5312
7	"	5926
8	"	5753
9	$Ü_6$	946
10	"	3375
11	$Ü_7$	2936
12	"	2211
13	"	1558
14	$Ü_8$	767
15	"	1098
16	K_{pos}	3025
17	"	3087
18	"	2698
19	K_{neg}	148
20	"	139
	Grenzwert	302

Tabelle I.11: Bestimmung des HBcAg-Gehaltes der Überstände $Ü_4$-$Ü_8$

Bis zum Überstand 8 sind zwar alle Proben noch deutlich HBcAg-reaktiv, es zeigt sich jedoch bei Überstand 8 schon eine Verringerung der Impulsraten.

EIA-HBcAg

Beschichtung der Mikrotiterplatten mit Anti-HBc
Die in der Testanleitung beschriebene Beschichtung der Mikrotiterplatten mit Anti-HBc in der Verdünnung 1:2000 in Karbonatpuffer resultiert aus folgendem Vorversuch:
Eine Mikrotiterplatte wurde mit einer Verdünnungsreihe des Anti-HBc-haltigen Serums K. beschichtet. Gleichzeitig wurde das HBcAg aus Überstand 1 der Leber C/2 in angegebener Form verdünnt und im zweiten Schritt zugegeben. Ausgewertet wurde der Versuch mit Anti-HBe-J^{125}-Reagenz.

	Anti-HBc					
Überstand Leber C/2	1:10	1:100	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000
1:1	23424	23079	21953	21529	15642	9265
1:2	15182	21166	23151	20176	15754	7969
1:4	12900	19395	20730	20449	12453	3294
1:12	5705	9455	11407	7840	5978	1622
1:12	5709	12197	14010	13370	7739	1710
1-3 1:12	7701	6702	6557			
4-6 Ph-Puf.				49	36	37
Phosph.-Puffer	66	77	59	48	48	40
NaCl	109	115	64	53	90	46

Tabelle I.12: Beschichtung einer Mikrotiterplatte mit einer Anti-HBc-Verdünnungsreihe und einer HBcAg-Verdünnungsreihe

Die sehr hohen Impulsraten erklären sich aus der Anti-HBe-J^{125}-Inkubationszeit von 20 Stunden bei Zimmertemperatur. Normalerweise reicht eine Inkubationszeit von 3 Stunden bei 45 °C.
Aus diesem Versuch ist zu ersehen, daß eine Anti-HBc-Verdünnung von 1:10 bis 1:2000 nur geringe Unterschiede in den Impulsraten verursacht. Bei einer 1:4000 und 1:8000 Verdünnung

des Anti-HBc fallen die Impulsraten rasch ab. Weiterhin bewirkt eine Verdünnung des HBcAg bis 1:4 einen geringen Abfall der gemessenen Impulsraten. Eine 1:12 Verdünnung zeigt demgegenüber schon ein deutliches Absinken der Impulsraten. Die niedrigeren Impulsraten des HBcAg bei einer relativ hohen Anti-HBc-Konzentration (Anti-HBc 1:10, HBcAg 1:2, 1:4) sind am ehesten als Prozoneneffekt zu erklären. Mit den Verdünnungen Anti-HBc 1:2000 und HBcAg 1:2 oder 1:4 wurde in den nachfolgenden Versuchen weitergearbeitet, sofern HBcAg nicht variabel zu wählen war.

Auswahl der Verdünnung des Konjugates
Anfängliche Probleme bei der Testauswertung mit dem selbstthergestellten Konjugat (enzymmarkiertes Anti-HBc) erklärten sich später aus der Auswahl der Verdünnung des Konjugates und seiner Zusätze, die eine Mitreaktion unspezifischer Bestandteile des Leberhomogenates und des Konjugates verhinderten.
Die Tabelle I.13 gibt ein Versuchsprotokoll mit einer Verdünnungsreihe des Konjugates wieder.
Neben der photometrischen Auswertung wurde eine Beurteilung mit dem bloßen Auge vorgenommen.
Zeichenerklärung:

+++	sehr starke Reaktion
++	starke Reaktion
+(+)	deutliche Reaktion
+	mäßige Reaktion
(+)	schwache Reaktion
-	keine sichtbare Reaktion

Aus diesem Versuch ist ersichtlich, daß eine Verdünnung des enzymmarkierten Anti-HBc-Konjugates von 1:50 oder 1:100 zu starke Extinktionen verursacht. Eine Verdünnung von 1:200 und 1:400 zeigt dagegen gute Resultate, während 1:800 schon zu stark verdünnt erscheint und 1:1600 keine brauchbaren Ergebnisse liefert.

Konjugat

	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600
Anti-HBc 1:2000 HBcAg 1:2	>2,0	>2,0	0,742	0,776	0,168	0,100
	+++	+++	++	+(+)	(+)	-
	>2,0	1,861	1,588	0,630	0,111	0,098
	+++	+++	++	+(+)	(+)	-
	>2,0	>2,0	n. g.	0,418	0,210	0,084
	+++	+++	++	+(+)	(+)	-
	>2,0	>2,0	0,944	0,725	0,155	0,120
	+++	+++	++	+(+)	(+)	-
Leerwert	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	-	-	-	-	-	-
nur Anti-HBc	0,964	0,470	0,132	0,094	0,084	0,066
	++	+	(+)	-	-	-
nur HBcAg	0,112	0,092	0,066	0,048	0,090	0,062
	(+)	(+)	-	-	-	-
Leerwert	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	+	(+)	-	-	-	-

Tabelle I.13: Verdünnungsreihe des Konjugates; HBcAg 1:2, Anti-HBc 1:2000; Konjugat für 2 Stunden zugegeben unter Zusatz von 1% Tween 20 und 20% NHS

Durchführung des EIA-HBcAg nach der Standardmethode
Nachdem die Konzentrationen und Verdünnungsstufen der einzelnen Testanteile ermittelt waren, wurde erneut ein Versuch unter den Bedingungen der Testanleitung angesetzt:

Anti-HBc 1:2000
HBcAg 1:4 konstant
Konjugat 1:200, 1:400, 1:800

Konjugat

	1:200	1:200	1:400	1:400	1:800	1:800
	1,800	0,990	0,870	0,765	0,645	0,540
	++	++	++	++	+(+)	+(+)
	1,860	0,915	0,910	1,065	0,636	0,558
	++	++	++	++	+(+)	+(+)
	n. g.	0,840	0,795	0,735	0,675	0,552
	++	++	++	++	+(+)	+(+)
	n. g.	0,825	0,810	0,720	0,570	0,522
	++	++	++	++	+(+)	+(+)
Leerwert	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	-	-	-	-	-	-
nur Anti-HBc	0,210	0,060	0,084	0,081	0,075	0,036
	(+)	-	-	-	-	-
nur HBcAg	0,240	0,012	0,063	0,010	0,546	0,000
	(+)	-	-	-	-	-
Leerwert	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	-	-	-	-	-	-

Tabelle I.14: Durchführung des EIA-HBcAg nach der Standardmethode

Die Beurteilung der Reaktionsstärke mit dem bloßen Auge erfolgte nach der für Tabelle I.13 beschriebenen Einteilung.

Wurde der HBcAg-Anteil im Test nicht konstant gehalten, sondern in einer Verdünnungsreihe zugegeben, so wurden die Ergebnisse erzielt, die in Tabelle I.15 aufgeführt sind.

Konjugat

	1:200	1:200	1:400	1:400	1:800	1:800
HBcAg 1:1	>2,0 +++	>2,0 +++	>2,0 +++	1,845 +++	0,920 ++	1,469 ++
HBcAg 1:4	>2,0 +++	>2,0 +++	1,108 ++	1,432 ++	0,461 +(+)	0,636 +(+)
HBcAg 1:10	1,242 ++	1,104 ++	1,160 ++	1,117 ++	0,298 +	0,510 +(+)
HBcAg 1:100	0,481 +(+)	0,366 +(+)	0,278 +	n. g. +	0,274 +	0,287 +
Leerwert	0,000 -	0,000 -	0,000 -	0,000 -	0,000 -	0,000 -
nur Anti-HBc	0,082 (+)	0,100 +	0,105 (+)	0,084 -	0,072 -	0,082 -
nur HBcAg 1:1	0,110 (+)	0,096 -	0,045 -	0,045 -	0,067 -	0,071 -
Leerwert	0,000 -	0,000 -	0,000 -	0,000 -	0,000 -	0,000 -

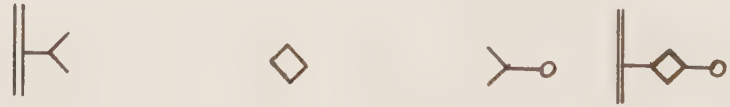
Tabelle I.15: EIA-HBcAg - Inkubation mit einer HBcAg-Verdünnungsreihe

Bei konstanter Anti-HBc-Beschichtung der Mikrotiterplatten ist eine deutliche Abhängigkeit der Extinktion von der Verdünnung des HBcAg und des Konjugates nachweisbar, Je höher die Konzentration des Konjugates, umso größere Probleme entstanden dadurch, daß mitgeführte Kontrollen falsch positiv reagierten.

Verwendung verschiedener Mikrotiterplatten
PVC-Mikrotiterplatten der Firmen Cooke und Dynateck wurden verwendet. Da pro Versuchsreihe auch Proben mitgeführt wurden, die in RIA-Technik im Szintillationszähler ausgewertet wurden, kamen nur Platten in Frage, die zerschneidbar waren. Ein Unterschied zwischen den Mikrotiterplatten der einzelnen Firmen und denen der gleichen Firma konnte nicht festgestellt werden.

Anti-HBc-Beschichtung der Mikrotiterplatten
Anti-HBc wird durch eine unspezifische Bindung an die Wand der Mikrotiterplatten adsorbiert. In den nachfolgenden Inkubationsschritten werden durch Zugabe von 1% Tween 20 weitere unspezifische Bindungen an die Wand verhindert. In einem Versuchsansatz wurde geprüft, ob sich die Anti-HBc-Beschichtung einsparen läßt und eine unspezifische Bindung des HBcAg an die Mikrotiterplatte gleich gute Ergebnisse erbringt wie die Vorbeschichtung mit Anti-HBc.

Versuchsaufbau:



Wand mit Anti-HBc | HBcAg (mit 1% Tween 20) | Konjugat

Verfahren mit Anti-HBc-Vorbeschichtung

Wand mit HBcAg (ohne Tween 20) | Konjugat

Verkürztes Verfahren ohne Anti-HBc-Vorbeschichtung

Die Auswertung erfolgte durch Abschätzen der Reaktionsstärke und durch Anti-HBe-J^{125}.

	Konjugat					
	1:200 cpm	1:400 cpm	1:800 cpm	1:200 cpm	1:400 cpm	1:800 cpm
HBcAg 1:2	65	92	269	562	-	1323
	+	(+)	-	+	(+)	-
	61	77	50	72	-	100
	+	(+)	-	+	(+)	-
	76	67	76	79	-	90
	+	(+)	-	+	(+)	-
	77	63	42	90	-	173
	+	(+)	-	+	(+)	-
	85	87	69	87	-	61
	+	(+)	-	+	(+)	-
Leerwert	20	23	20	22	-	21
	-	-	-	-	-	-
	20	26	17	24	-	23
	-	-	-	-	-	-
	16	35	21	26	-	33
	-	-	-	-	-	-

Tabelle I.16: EIA-HBcAg - Testansatz ohne Anti-HBc-Vorbeschichtung

Allein die Beurteilung mit dem bloßen Auge zeigte deutlich schwächere Reaktionen an als mit Anti-HBc-Vorbeschichtung. Die gemessenen Impulsraten bestätigten dieses.

Zusätze zum Konjugat

Tween 20 und negatives Humanserum (NHS) wurden dem Konjugat in verschiedener Konzentration zugegeben. Eine Erhöhung der Tween 20-Konzentration auf über 1% ergab keine Verbesserung der Resultate mehr, die durch eine Verhinderung von unspezifischen Bindungen an die Wände der Mikrotiterplatten zustandekam.

Als negatives Humanserum wurde die negative Kontrolle des AUSRIA^{R}-II-125-Tests hinzugefügt, die für HBsAg und Anti-HBs

nicht reaktiv ist. Die Zugabe von negativem Humanserum zum Konjugat dient dazu, unspezifische Bindungen zwischen Konjugat und Anti-HBc- oder HBcAg-Anteil des Tests zu verhindern. Bis zu einer Endkonzentration von 20% wurde die Zugabe des negativen Humanserums zum Konjugat gesteigert. Diese Konzentration erbrachte gegenüber niedrigeren Konzentrationen von 1%, 5% und 10% bessere Ergebnisse. Eine 50%ige Zugabe war ohne weiteren positiven Einfluß auf die Qualität des Konjugates.

Vergleich des enzymmarkierten Konjugates mit dem Anti-HBe-J^{125}-Reagenz des ABBOTT-HBe^{TM}-Tests

Nach Anti-HBc-Beschichtung und Inkubation mit HBcAg wurde die Mikrotiterplatte in zwei Hälften geteilt. Eine Hälfte wurde mit dem enzymmarkierten Konjugat beschichtet, später der Substratumsatz gemessen. Die andere Hälfte wurde nach Zugabe von 100 µl Anti-HBe-J^{125}-Reagenz für drei Stunden bei +37 ^{o}C inkubiert, gewaschen und im Szintillationszähler ausgewertet. Der in EIA-Technik ausgewertete Teil wurde schon in Tabelle I.14 dargestellt. Zum direkten Vergleich mit dem in RIA-Technik ausgewerteten Teil wurden die Extinktionswerte nochmals wiederholt.

Konjugat

	1:200	1:200	1:400	1:400	1:800	1:800
Anti-HBc 1:2000	1,800	0,990	0,870	0,765	0,645	0,540
	8472	8422	8485	8517	10966	10259
HBcAg 1:4	1,860	0,915	0,810	1,065	0,636	0,558
	8059	7849	7684	7819	11267	10049
	n. g.	0,840	0,795	0,735	0,675	0,552
	7470	8171	7121	7713	11512	9892
	n. g.	0,825	0,810	0,720	0,570	0,522
	8115	8422	7200	8228	12162	5877
Leerwert	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	25	27	30	25	38	24
nur Anti-HBc 1:2000	0,210	0,060	0,084	0,081	0,075	0,036
	39	47	34	49	55	55
nur HBcAg 1:4	0,240	0,012	0,063	0,010	0,546	0,000
	31	43	85	77	308	838
Leerwert	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	25	33	26	32	26	34

Tabelle I.17: Vergleich des enzymmarkierten Konjugates mit dem Anti-HBe-J^{125}-Reagenz

Im Gegensatz zum 1:200, 1:400 und 1:800 verdünnten Konjugat wurde Anti-HBe-J^{125} unverdünnt zugegeben.

Ein Vergleich zwischen enzymmarkiertem Konjugat und Anti-HBe-J^{125} wurde auch mit dem in Tabelle I.15 beschriebenen Versuch durchgeführt, in dem eine Verdünnungsreihe des HBcAg untersucht wurde.

Konjugat

	1:200	1:200	1:400	1:400	1:800	1:800
HBcAg 1:1	>2,0	>2,0	>2,0	1,845	0,920	1,469
	3963	4470	2972	5861	4920	5546
HBcAg 1:4	>2,0	>2,0	1,108	1,432	0,461	0,636
	3150	3048	2851	4112	4325	n. g.
HBcAg 1:10	1,242	1,104	1,160	1,117	0,298	0,510
	1485	1635	977	2590	2061	3427
HBcAg 1:100	0,481	0,366	0,278	n. g.	0,274	0,287
	221	407	462	614	936	422
Leerwert	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	49	26	28	23	37	28
nur Anti-HBc 1:2000	0,082	0,100	0,105	0,084	0,072	0,082
	54	71	79	51	53	47
nur HBcAg 1:1	0,110	0,096	0,045	0,045	0,067	0,071
	66	55	53	48	57	61
Leerwert	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	33	35	47	45	28	37

Tabelle I.18: Vergleich des enzymmarkierten Konjugates mit dem Anti-HBe-J^{125}-Reagenz

Auch hier wurde Anti-HBe-J^{125} unverdünnt zugegeben. In den senkrechten Spalten 1, 2 und 3 wurde ein Anti-HBe-J^{125}-Reagenz benutzt, das schon dem Verfalldatum nahe war. In den Spalten 4, 5 und 6 wurde ein frischeres Reagenz verwendet, das auch die höheren Impulsraten erklärt.
Beide Vergleiche zeigen an, daß beim enzymmarkierten Konjugat die waagerechten Reihen 6 und 7 etwas stärker mitreagieren als beim Anti-HBe-J^{125}.

Auswertung einer Testreihe im EIA-HBcAg und Vergleich mit dem ABBOTT-HBe^{TM}-Test

Anhand einer Untersuchung von 30 Proben auf HBcAg wurde nachgewiesen, daß der EIA-HBcAg in der beschriebenen Form anwendbar ist. Da es keine HBcAg-positiven Serumproben gibt, mußten Leberproben untersucht werden. Die untersuchten Proben und Verdünnungen aus der zweiten Aufarbeitung der Leber C sind in der folgenden Tabelle angegeben.

Konjugat

	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400
Anti-HBc 1:2000	P_0 >2,0	P_1 >2,0	P_2 >2,0	P_3 >2,0	P_4 >2,0	P_5 >2,0
	P_6 0,092	V_1P_0 >2,0	V_1P_1 1,955	V_1P_2 1,520	V_1P_3 >2,0	V_2P_0 1,546
	V_2P_1 1,208	V_2P_2 1,077	V_2P_3 1,220	V_3P_0 0,914	V_3P_1 1,190	V_3P_2 0,968
	V_6P_0 0,341	V_6P_1 0,108	V_6P_2 0,263	V_7P_0 0,366	V_7P_1 0,065	V_7P_2 0,094
	K_{pos} HBeAg 0,082	K_{pos} HBeAg 0,049	K_{pos} HBeAg 0,057	K_{neg} 0,100	K_{neg} 0,077	K_{neg} 0,056
nur Anti-HBc 1:2000	0,036	0,095	0,112	0,052	0,060	0,075
nur HBcAg	P_0 0,072	P_1 0,105	P_2 0,047	P_3 0,044	P_4 0,068	P_5 0,081
Leerwert	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Tabelle I.19: Untersuchung von 30 HBcAg-positiven Proben im EIA-HBcAg

Die nachstehende Tabelle gibt die Ergebnisse derselben Proben im ABBOTT-HBe^{TM}-Test an. Im RIA nicht reaktive Proben wurden besonders gekennzeichnet.

P_0 19865	P_1 35057	P_2 19778	P_3 25858	P_4 24875	P_5 14974
P_6 253 neg	V_1P_0 8226	V_1P_1 8919	V_1P_2 6099	V_1P_3 19968	V_2P_0 4690
V_2P_1 2117	V_2P_2 1750	V_2P_3 2747	V_3P_0 2119	V_3P_1 1405	V_3P_2 1239
V_6P_0 460	V_6P_1 405 neg	V_6P_2 488	V_7P_0 419	V_7P_1 278 neg	V_7P_2 329 neg
K_{pos} P_2LC 3470	K_{pos} P_2LC 3557	K_{pos} P_2LC 3251	K_{neg} 146 neg	K_{neg} 176 neg	K_{neg} 195 neg

Tabelle I.20: Untersuchung von 30 HBcAg-positiven Proben im ABBOTT-HBe^{TM}-Test

Beim EIA wie auch beim RIA sind die HBcAg-negativen Proben erkennbar. Die positive Kontrolle des ABBOTT-HBe^{TM}-Tests reagierte nicht im EIA. Dies zeigt nochmals, daß die Mikrotiterwand mit einem monospezifischen Anti-HBc beschichtet wurde und der Test tatsächlich nur HBcAg ohne HBeAg mißt. Die positive Kontrolle enthält als rekalzifiziertes Humanserum HBeAg und HBsAg, jedoch kein HBcAg, das in diesem Test nachweisbar wäre.

Diskussion

Die Entwicklung des EIA-HBcAg ist gekennzeichnet durch die Präparation des für den Test erforderlichen Antigens HBcAg und des Antikörpers Anti-HBc sowie durch die Untersuchungen zu den Testbedingungen.
Zur Präparation des Anti-HBc stand ein Patientenserum zur Verfügung, das neben dem Anti-HBc die zwei Antigene HBsAg und HBeAg enthielt. Die Anwesenheit dieser beiden Antigene schließt die Antikörper Anti-HBs und Anti-HBe in diesem Serum aus. Es fand sich also Anti-HBc als alleiniger Antikörper der möglichen Hepatitis-B-Marker.
Abbildung 7 zeigt ein normales serologisches Profil der Hepatitis-B-Marker für eine akute Hepatitis-B-Infektion.

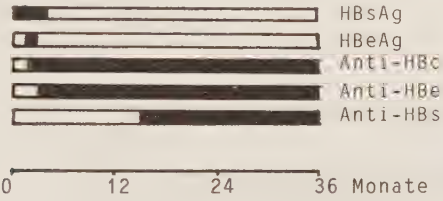


Abbildung 7: Serologisches Profil eines normalen Hepatitis-B-Verlaufs (50)

Zeitliche Abfolge: kurz nach Auftreten des HBsAg tritt das HBeAg und noch etwas später das Anti-HBc als erster Antikörper im Serum auf. HBeAg wird wenig später ohne zeitliche Verzögerung durch Anti-HBe ersetzt. Das Auftreten des Anti-HBs nach etwa einem Jahr bedeutet Immunität gegen Hepatitis-B. Möglich ist auch, daß Anti-HBc persistiert und Anti-HBe und Anti-HBs nach einiger Zeit im Serum nicht mehr nachweisbar sind.
Bei dem oben erwähnten Patienten lag jedoch keine akute Hepatitis vor. Er war HBsAg-Träger.

Overby, Ling et al. (50) beschrieben drei mögliche serologische Profile für den HBsAg-Träger:
Einmal den symptomlosen HBsAg-Träger, bei dem HBsAg und Anti-HBc im Serum persistieren. HBeAg bleibt für einige Zeit nachweisbar, schwindet jedoch später zugunsten seines Antikörpers Anti-HBe, der dann ebenfalls im Serum persistiert. Abbildung 8 zeigt diesen Fall.

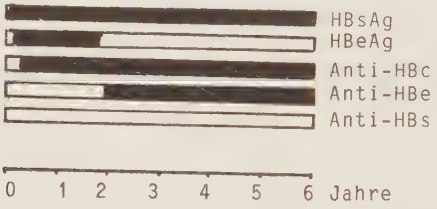


Abbildung 8: HBsAg-Träger mit Serokonversion von HBeAg zu Anti-HBe (50)

Weiterhin korreliert die chronisch aktive Hepatitis mit dem Persistieren von HBsAg, HBeAg und Anti-HBc im Serum.

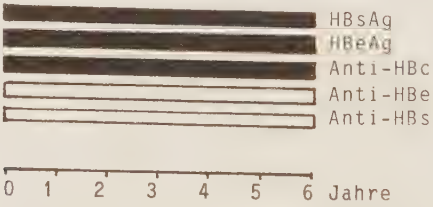


Abbildung 9: Serologisches Profil eines HBsAg- und HBeAg-Trägers (50)

Als dritte Möglichkeit beschreiben sie das Persistieren von HBsAg und Anti-HBc und den sehr späten Übergang von HBeAg zu Anti-HBe im Serum. Klinisch korreliert dieses Profil der Hepatitis-B-Marker mit einem Übergang von der chronisch aktiven zur chronisch persistierenden Hepatitis.

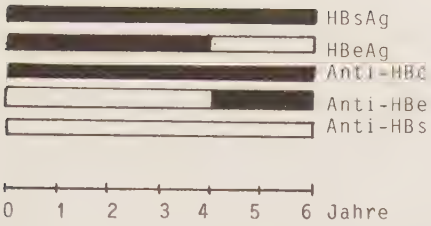
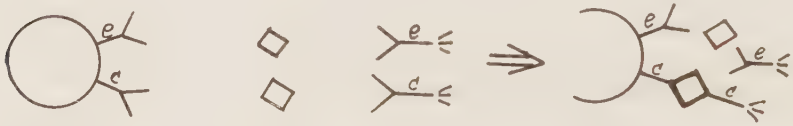


Abbildung 10: HBsAg-Träger mit später Serokonversion von HBeAg zu Anti-HBe (50)

Von dem Patienten des monospezifischen Anti-HBc war bekannt, daß er seit wenigstens zwei Jahren diese Serumkonstellation der Hepatitis-B-Marker hatte. Serumuntersuchungen über eine mögliche Serokonversion von HBeAg zu Anti-HBe wurden jedoch nicht weiter durchgeführt.

HBcAg findet sich in seiner antigenwirksamen Form nicht frei im Serum. Es läßt sich aber aus Dane-Partikeln im Serum extrahieren. Der Bildungsort des HBcAg sind die Zellkerne der Leberzellen. Da HBcAg im Gegensatz zu seinem Antikörper Anti-HBc also relativ schwer zugänglich ist, gibt es bisher keine kommerziellen Tests, um HBcAg nachzuweisen. Die Tests zum Nachweis dieses Antigen-Antikörpersystems beschränken sich auf die Bestimmung des Anti-HBc im Serum oder Plasma. Anti-HBc liegt im Serum - bis auf wenige Ausnahmen - nicht monospezifisch vor, sondern ist mit Anti-HBe und/oder Anti-HBs vermischt (vgl. Abbildung 7). Bei HBsAg-Trägern liegt ein Anti-HBc/Anti-HBe-Gemisch vor und nur bei Persistieren von HBsAg und HBeAg tritt Anti-HBc als alleiniger Antikörper im Serum auf.
Das gleichzeitige Vorliegen von Anti-HBe- und Anti-HBc-Antikörpern blieb bei den bisherigen Tests ohne Bedeutung, da Anti-HBc ohne sein Antigen HBcAg nicht mitreagieren konnte. Eine Untersuchung der Anti-HBe-J^{125}- und Anti-HBc-J^{125}-Reagenzien, die zum CORAB^{TM}- und ABBOTT-HBe^{TM}-Test gehören, bestätigte diese Überlegung. Sowohl das Anti-HBe-J^{125}- als auch

das Anti-HBc-J^{125}-Reagenz erbrachten im CORAB^{TM}-Test wie im ABBOTT-HBe^{TM}-Test vergleichbare Ergebnisse. Die Beschichtung der Kunststoffkugeln mit HBcAg im CORAB^{TM}-Test ist eindeutig. Die Beschichtung der Kunststoffkugeln im ABBOTT-HBe^{TM}-Test erfolgte mit einem Anti-HBe-/Anti-HBc-Gemisch, so daß auf der Oberfläche wiederum beide Antikörper vorhanden sind. Ein monospezifisches Anti-HBe wurde bisher nicht beschrieben. Es ist auch nicht zu erwarten, da Anti-HBc bei Erkrankungsbeginn immer nachweisbar ist (69).
Das folgende Schema verdeutlich nochmals den Nachweis von HBcAg im ABBOTT-HBe^{TM}-Test.



Anti-HBe/ Anti-HBc | HBcAg | Anti-HBe-J^{125}/ Anti-HBc-J^{125}

Durch Zugabe der HBcAg-haltigen Probe reagierten in diesem Test aus den Antikörpergemischen jeweils die Bestandteile mit der Spezifität Anti-HBc. Die Anti-HBe-Bestandteile des Tests reagierten dann, wenn eine Serumprobe zugegeben wurde, die nur HBeAg enthalten kann.
Zusammenfassend kann man aus diesen Erkenntnissen folgern, daß der ABBOTT-HBe^{TM}-Test zwar für die Bestimmung von HBeAg in Serumproben entwickelt wurde, mit seiner Hilfe jedoch auch HBcAg bestimmt werden kann. Es muß allerdings bewiesen werden, daß es sich auch um HBcAg handelt. Dieses ist nur durch Neutralisation des Antigens mit einem Reagenz möglich, das monospezifisch Anti-HBc enthält.

Präparation des HBcAg

Cohen und Cossart (10) beschrieben eine Möglichkeit, HBcAg aus einer menschlichen Leber zu präparieren. Die Extraktionsidee wurde um einen Schritt erweitert. Durch Erhitzung der Leberproben sollte ihre Infektiosität durch eine Inaktivierung von möglicherweise vorhandenem HBsAg und HBeAg herabgesetzt werden. Gleichzeitig sollte die Ausbeute des in der Leber vermuteten HBcAg in Abhängigkeit vom Erhitzungsgrad untersucht werden. Eventuell in der Leber vorhandene Antikörper würden durch Erhitzen ebenfalls inaktiviert werden. HBeAg, das auch durch Hitze inaktiviert werden würde, wurde in der Leber nicht nachgewiesen. HBsAg fand sich in der nicht erhitzten Probe am stärksten positiv und war ab einer Erhitzung von 75 ^{o}C nicht mehr nachweisbar.
Mit Hilfe der oben beschriebenen Methoden konnte bewiesen werden, daß HBcAg im ABBOTT-HBe^{TM}-Test die positive Reaktion verursachte. Nur die auf 95 ^{o}C erwärmte Probe war HBcAg-negativ. Die übrigen Proben waren HBcAg-positiv, wobei die zwischen 65 ^{o}C und 80 ^{o}C erhitzten Proben am stärksten positiv waren. Die nicht erwärmte Leberprobe war weniger ausgeprägt positiv. Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die HBcAg-Ausbeute bei Präparationen aus menschlicher Leber durch Erhitzen der Proben auf Temperaturen von 65 - 80 ^{o}C erhöht werden kann.

EIA-HBcAg

Die Präparation der zur Testentwicklung erforderlichen Materialien, des Anti-HBc und HBcAg, wurde schon beschrieben und diskutiert. Das Konjugat, das mit Meerrettichperoxidase markierte Anti-HBc, wurde nach der von Nakane und Kawaoi (44) beschriebenen Anleitung erstellt. Seine Funktionsfähigkeit wurde dadurch überprüft, daß die zweite Hälfte der Mikrotiterplatte mit dem Anti-HBe-J^{125} aus dem ABBOTT-HBe^{TM}-Testkit ausgewertet wurde.
Die für unseren Test bestmögliche Verdünnung des Konjugates wurde in einer Verdünnungsreihe ausgetestet. Dabei zeigte sich,

daß eine Verdünnung von 1:200 bis 1:800 die besten Ergebnisse erbrachte. Stärkere Verdünnungen, z.B. 1:1600, führten zu unspezifischen, nicht mehr interpretierbaren Ergebnissen. Höhere Konzentrationen, z.B. 1:50 und 1:10, färbten in zu starkem Ausmaß auch die negativen Kontrollwerte des Testes, die nur mit Anti-HBc (Reihe 6) oder HBcAg (+ 1% Tween 20, Reihe 7) beschichtet waren.

Die Beschichtung der Mikrotiterplatte mit Anti-HBc erfolgte durch eine unspezifische Bindung. Dabei konnten sich alle Stoffe an die Wand der Mikrotiterplatte anlagern, die sich in der Anti-HBc-Lösung befanden. Im nächsten Schritt wurde HBcAg zugegeben, das sich spezifisch an Anti-HBc anlagerte. Um dabei auch mögliche unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde Tween 20 zur HBcAg-Lösung gegeben. Dem enzymmarkierten Anti-HBc (Konjugat) wurde ebenfalls Tween 20 zugesetzt, da das Konjugat nur die spezifische Bindung zu HBcAg eingehen sollte. Die Endkonzentration von 1% Tween 20 in der HBcAg- und Konjugatlösung zeigte die besten Ergebnisse.

Das Anti-HBc zur Vorbeschichtung und im Konjugat wurde aus menschlichem Serum gewonnen, während HBcAg aus menschlicher Leber präpariert wurde. Das Anti-HBc-haltige Serum wurde einer Natriumsulfatfällung unterzogen, um die Menge der unspezifischen Stoffe zu verringern, die im Test interferieren könnten. Zusätzlich wurde dem Konjugat negatives Humanserum (NHS) zugesetzt, um eine unspezifische Bindung zwischen Konjugatbestandteilen und Teilen der Anti-HBc- oder HBcAg-Lösung zu verhindern. Eine Endkonzentration von 20% negativem Humanserum im Konjugat erbrachte die beste Unterscheidung zwischen positiven und negativen Kontrollen.

Ein Vergleich zwischen dem enzymmarkierten Konjugat und dem Anti-HBe-J^{125}-Reagenz zeigte, daß die Auswertung in RIA-Technik die unvollständigen Testansätze etwas deutlicher als negativ erkennen ließ. Das enzymmarkierte Konjugat ergab für diese Testreihen relativ höhere Extinktionen trotz der Konjugatzusätze. Dennoch sind diejenigen Proben, die HBcAg enthielten, noch eindeutig als positiv zu erkennen. Die Mit-

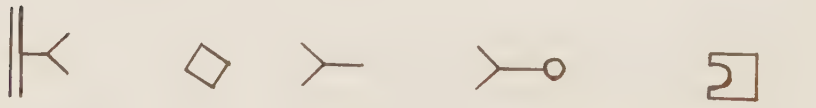
reaktion der unvollständigen Testansätze muß zum einen auf geringste Verunreinigungen während der Waschvorgänge und auf unspezifische Bindungen des Konjugates an die Wand der Mikrotiterplatte zurückgeführt werden, die durch Zusätze zum Konjugat nicht mehr verhindert werden konnten. Zum anderen muß davon ausgegangen werden, daß sich HBcAg trotz Zugabe von 1% Tween 20 in geringer Menge unspezifisch an die Wand gebunden hatte.
Positive und negative Kontrollen mußten für den EIA-HBcAg selbst definiert werden, da es keine standardisierten Testseren gibt. Als positive Kontrolle dienten die im RIA als hoch positiv gewerteten unverdünnten Proben P_1 - P_4 der Leber C. Als negative Kontrolle dienten die Testreihen 6 und 7, die als unvollständige Testansätze oben schon erwähnt wurden. Der Grenzwert wurde auf das 2,2-fache des Mittelwertes dieser beiden negativen Kontrollen festgesetzt. Proben, deren Extinktion höher lag, galten als HBcAg-positiv.
Bei der Auswertung einer Testreihe im EIA-HBcAg wurde auch die positive Kontrolle des ABBOTT-HBe^{TM}-Tests untersucht. Diese Kontrolle enthielt HBeAg und HBsAg. Die Hälfte der Mikrotiterplatte, die in EIA-Technik ausgewertet wurde, ergab für diese positive Kontrolle ebenso wie für die negative Kontrolle des ABBOTT-HBe^{TM}-Tests niedrige Extinktionswerte, die denen der beiden unvollständigen Testansätze ähnlich waren. Die Auswertung in RIA-Technik ergab für die positive Kontrolle hohe und für die negative Kontrolle niedrige Impulsraten. Daraus ist zu entnehmen, daß der EIA-HBcAg tatsächlich nur HBcAg mißt und nicht HBeAg und HBcAg, wie es beim ABBOTT-HBe^{TM}-Test möglich ist.
Ein Vergleich zwischen dem ABBOTT-HBe^{TM}-Test und dem EIA-HBcAg bestätigte die Anwendbarkeit des selbstentwickelten Tests. Alle negativen Kontrollwerte waren in beiden Tests als solche erkennbar und alle positiven Proben wurden in beiden Tests gleichermaßen herausgefunden. Wegen der geringen Zahl der zur Verfügung stehenden Proben war hier eine genauere Untersuchung nicht möglich. Erst der EIA-Anti-HBc, der auf Erkenntnissen des EIA-HBcAg aufbaute, konnte ausführlicher mit mit dem entsprechenden RIA, dem CORAB^{TM}-Test, verglichen werden.

II. Entwicklung eines Enzymimmunoassays zur Bestimmung von Anti-HBc

Einführung

Die Anwendung der Enzymimmunoassay-Technik zur Bestimmung von Anti-HBc-IgM setzte die Entwicklung praktikabler Enzymimmunoassays für HBcAg und Anti-HBc voraus.
Nach der Beschreibung des HBcAg im Viruskern 1971 durch Almeida et al. (1) wurden verschiedene Testmethoden beschrieben, um das Anti-HBc im Serum nachzuweisen, z.B. die Fluoreszenz-Antikörper-Methode (5), die Komplement-Fixation (34), die Immunelektroosmophorese (8) und die Radioimmunpräzipitationsmethode (42). 1973 entwickelten Purcell et al. (51), 1976 Overby und Ling (49) und 1977 Howard und Zuckerman (37) einen Radioimmunoassay zum Anti-HBc-Nachweis.
Die Bestimmung des Anti-HBc in Enzymimmunoassay-Technik ist mit kommerziellen Tests seit 1981 möglich (z.B. mit Corzyme^{TM}).

Testprinzip des EIA-Anti-HBc



Anti-HBc | HBcAg | Anti-HBc (Probe) | Anti-HBc-HRPO (Konjugat) | OPD + UP (Substrat)

An Mikrotiterplatten adsorbiertes Anti-HBc wird mit einer konstanten Menge HBcAg inkubiert, das sich spezifisch an die Antikörper bindet. Anschließend werden Proben zugegeben, die auf ihren Anti-HBc-Gehalt untersucht werden sollen. Im nächsten Schritt wird Anti-HBc-HRPO (Konjugat) zugefügt. Enthielt

die untersuchte Probe Anti-HBc, so konnte sich kein oder nur wenig Anti-HBc-HRPO an HBcAg binden. Enthielt die Probe kein Anti-HBc, so konnte sich viel Anti-HBc-HRPO an HBcAg binden. Es gilt: je niedriger die photometrisch bestimmte Extinktion der Probe im 492 nm Filter, um so höher ist der Anti-HBc-Gehalt der Probe.

Materialien und Methoden

Festphase
Ebenso wie beim EIA-HBcAg wurden Mikrotiterplatten der Firma Cooke aus zerschneidbarem PVC verwendet.

Anti-HBc-Vorbeschichtung
Zur Beschichtung der Mikrotiterplatte wurde der monospezifische Antikörper gegen HBcAg benutzt.

HBcAg-Beschichtung
Nach der Inkubation mit Anti-HBc wurde die Testplatte mit dem HBcAg beschichtet, das aus der Leber C präpariert worden war.

Konjugat
Zur Auswertung des Tests wurde das gleiche Konjugat zugegeben, das schon für den EIA-HBcAg entwickelt worden war. Es handelte sich um das monospezifische Anti-HBc, das nach einer Markierungsanleitung von Nakane und Kawaoi (44) mit dem Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt worden war. Zur Kontrolle des selbsterstellten Konjugates wurde die zweite Hälfte der Mikrotiterplatte mit kommerziellem Anti-HBe-J^{125} des ABBOTT-HBe^{TM}-Tests ausgewertet.
Der EIA-Anti-HBc-Test wurde in Bezug auf Inkubationszeit und -temperatur des selbsterstellten Konjugates variiert.
Die nachstehende Testanleitung gibt die Standardmethode des EIA-Anti-HBc wieder.

Testanleitung:
1) Beschichtung einer Mikrotiterplatte mit je 100 µl Anti-HBc, 1:100 verdünnt in Karbonat-Puffer, pH 9,6, 0,1 M.
Inkubation über Nacht bei Zimmertemperatur.
2) Mikrotiterplatte fünfmal waschen mit 200 µl tweenhaltiger Waschlösung der Firma Organon (Oss, Niederlande).
3) Zugabe von je 100 µl HBcAg-haltigem Überstand der Leber C, 1:2 verdünnt in Karbonat-Puffer, pH 9,6, 0,1 M, mit Zusatz

von 1% Tween 20.
Inkubation bei Zimmertemperatur über Nacht.
4) Waschen der Mikrotiterplatte wie unter Punkt 2 beschrieben.
5) Zugabe von 100 µl Anti-HBc-positiven Testserums, 1:100 verdünnt in Karbonat-Puffer, pH 9,6, 0,1 M, mit Zusatz von 1% Tween 20.
Inkubation drei Stunden bei Zimmertemperatur.
6) Waschen der Mikrotiterplatte wie unter Punkt 2 beschrieben.
7) Zugabe von 100 µl Anti-HBc-HRPO (Konjugat), 1:8 verdünnt in Karbonat-Puffer, pH 9,6, 0,1 M, mit Zusatz von 1% Tween 20 und 20% negativem Humanserum (negative Kontrolle des AUSRIA^{R}II-125).
Inkubation für eine Stunde bei 37 ^{o}C.
8) Waschen der Mikrotiterplatte wie unter Punkt 2 beschrieben.
9) Zugabe von 100 µl des Substrates OPD (Ortho-Phenylen-diamin) und UP (Ureaperoxid) der Firma Organon.
Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit.
10) Zugabe von 100 µl 3N H_2SO_4 beendet die Enzymreaktion.
11) Photometrische Bestimmung der Extinktion der Proben bei 492 nm gegen Leerwerte, die physiologische Kochsalzlösung enthielten und anschließend mit Substrat und 3N H_2SO_4 inkubiert wurden.

Als positive Kontrolle wurden die Extinktionen der Proben gewertet, denen monospezifisches Anti-HBc des Patienten K. unverdünnt zugegeben wurde. Den negativen Proben war kein Anti-HBc zur Inhibition zugegeben worden.
Grenzwert: Als Anti-HBc-positiv wurden die Proben gewertet, deren Inhibition größer oder gleich 50% der negativen Kontrollen war.

Ergebnisse

Die Entwicklung des EIA-Anti-HBc baut auf den Ergebnissen des EIA-HBcAg auf.
Zur Festlegung der konstanten Konzentrationen für die Beschichtung der Mikrotiterplatte mit Anti-HBc und HBcAg wurde genauso vorgegangen wie im EIA-HBcAg.
Ein Vergleich zwischen drei Mikrotiterplatten mit unterschiedlichen Konzentrationen zeigte, daß höhere Konzentrationen in der Vorbeschichtung eine deutlichere Inhibition im Test erzielten.
Tabelle II.1 zeigt eine Versuchsreihe im EIA-Anti-HBc unter den in der Testanleitung beschriebenen Bedingungen. Als Anti-HBc-positives Testserum wurde das monospezifische Anti-HBc des Patienten K. in einer Verdünnungsreihe zugegeben.
Die zweite Hälfte dieser Mikrotiterplatte wurde nicht mit dem enzymmarkierten Anti-HBc (Konjugat) ausgewertet, sondern mit Anti-HBe-J^{125}-Reagenz. Die Impulsraten stehen zum Vergleich unter den Extinktionswerten angegeben.

Konjugat	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	
Anti-HBc 1:10	0,244 1698	0,181 1172	0,156 1311	0,092 949	0,245 1217	0,095 851	E cpm
Anti-HBc 1:100	0,410 2333	0,225 1796	0,335 1641	0,370 1685	0,288 1937	0,195 1470	E cpm
Anti-HBc 1:1000	0,671 3144	0,289 3452	0,365 2801	0,442 1598	0,522 2680	0,380 2979	
Anti-HBc 1:10000	1,366 4725	0,588 4469	0,760 5247	1,108 3026	0,995 4719	0,771 5022	
Leerwert	0,000 19	0,000 37	0,000 40	0,000 32	0,000 82	0,000 61	
K_{pos} Anti-HBc 1:1	0,046 135	0,065 231	0,059 97	0,093 141	0,116 479	0,091 254	
K_{neg} kein Anti-HBc	>2,0 6181	1,649 8812	1,922 8040	>2,0 5725	>2,0 7164	1,786 n. g.	
Leerwert	0,000 21	0,000 28	0,000 51	0,000 37	0,000 35	0,000 68	

Tabelle II.1: Untersuchung einer Anti-HBc-Verdünnungsreihe im EIA-Anti-HBc

Aus der Tabelle geht eine regelmäßige mit der Verdünnung des Anti-HBc abnehmende Inhibition des enzymmarkierten Konjugates ebenso wie des Anti-HBe-J^{125} hervor.

Abbildung 11 zeigt diese Abhängigkeit für das enzymmarkierte Konjugat.

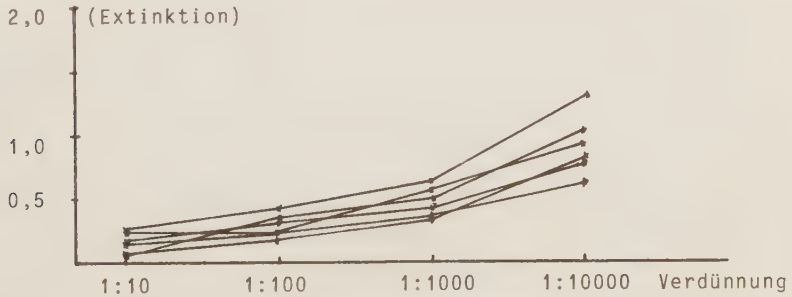


Abbildung 11: Darstellung der abnehmenden Inhibition der Anti-HBc-Verdünnungsreihe aus Tabelle II.1

Untersuchung der Inkubationszeit und der Inkubationstemperatur des Konjugates

Sowohl die Inkubationszeit als auch -temperatur des enzymmarkierten Konjugates wurden untersucht. Die Zeit wurde zwischen 20 und 120 Minuten bei 37 ^{o}C und zwischen 20 und 90 Minuten bei 50 ^{o}C variiert. Als Anti-HBc-positives Serum wurde das monospezifische Anti-HBc in einer Verdünnungsreihe verwendet. In diesem Versuch war die Anti-HBc-Verdünnung zur Beschichtung der Mikrotiterplatte noch abweichend von der Standardmethode 1:2000 gewählt worden; die Verdünnung des Konjugates wurde auf 1:8 in Karbonatpuffer festgelegt. Positive und negative Kontrollen, sowie Leerwerte, gegen die gemessen wurde, wurden nicht mit aufgeführt.

Konjugat 20 min 37 °C	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
	0,352	0,316	0,339	0,602	0,488	0,561
	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096
	0,598	0,762	0,756	0,878	0,790	0,682
Konjugat 40 min 37 °C	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
	0,149	n. g.	0,257	0,324	0,362	0,662
	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096
	0,642	1,011	1,073	1,063	1,002	1,091
Konjugat 60 min 37 °C	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
	0,207	0,351	0,399	0,596	0,700	1,438
	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096
	1,014	1,057	1,074	1,140	1,257	1,201
Konjugat 90 min 37 °C	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
	0,995	0,544	0,920	0,770	1,152	1,438
	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096
	1,482	1,448	1,211	1,165	1,507	1,175
Konjugat 120 min 37 °C	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
	0,109	0,200	0,581	0,518	0,824	1,415
	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096
	1,409	1,418	1,436	1,972	1,522	>2,0
Konjugat 20 min 50 °C	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
	0,303	0,434	0,584	0,700	0,798	1,064
	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096
	1,086	1,135	1,281	0,922	1,212	1,342
Konjugat 40 min 50 °C	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
	0,278	0,271	0,471	0,516	0,471	0,775
	1:128	1:256	1:512	1:1014	1:2028	1:4096
	0,996	1,518	1,073	1,063	1,418	1,638
Konjugat 90 min 50 °C	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
	0,524	1,151	1,289	0,884	1,530	1,354
	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096
	1,819	>2,0	1,734	>2,0	1,826	1,330

Tabelle II.2: Abhängigkeit des Konjugates von der Inkubationszeit und der Inkubationstemperatur

Vergleicht man die fünf Testreihen der Tabelle, die bei 37 °C ausgewertet wurden, so erkennt man einen Anstieg der Extinktionswerte mit der Länge der Inkubationszeit. Dieser Anstieg ist bei höheren Verdünnungen besonders deutlich. In Abbildung 12 werden die Extinktionswerte der Verdünnungsreihen dargestellt, die 20, 60 und 120 Minuten inkubiert wurden.

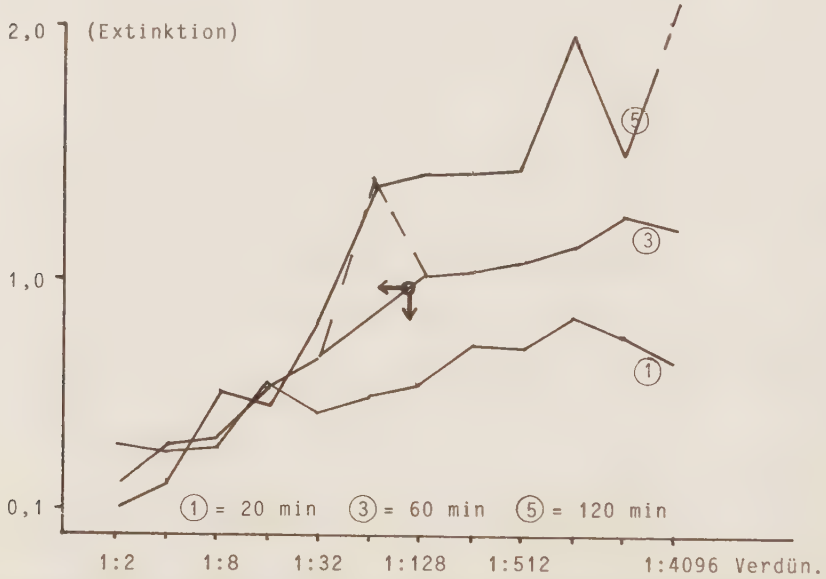


Abbildung 12: Graphische Darstellung der Abhängigkeit des Konjugates von der Inkubationszeit bei 37 °C

Eine Probenverdünnung von 1:100 in Karbonatpuffer und eine Inkubationszeit des Konjugates von 60 Minuten bei 37 °C (Kurve 3), wie sie für die Standardmethode angegeben wurde, zeigt eine mittlere Extinktion von etwa 1,0 (siehe Pfeil).

Abbildung 13 stellt die Extinktionswerte für 20 und 90 Minuten bei 50 °C dar.

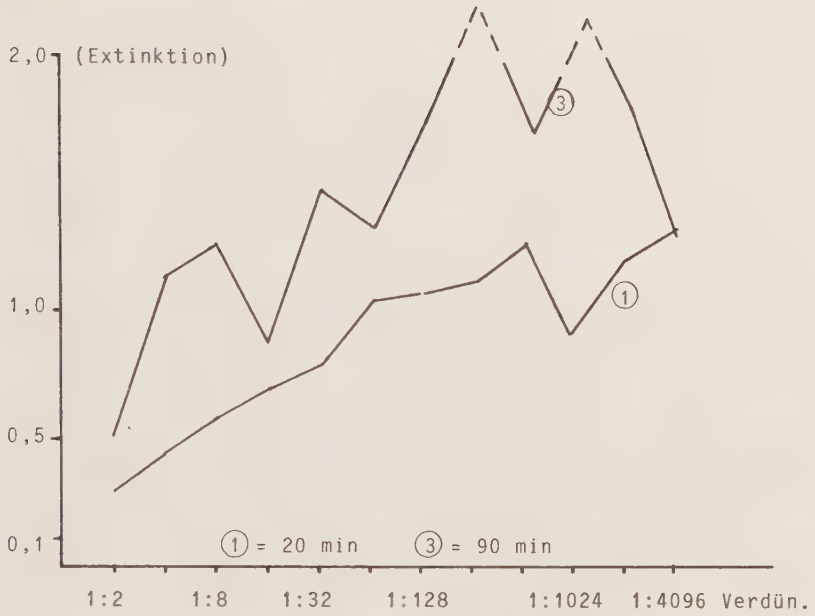


Abbildung 13: Graphische Darstellung der Abhängigkeit des Konjugates von der Inkubationszeit bei 50 °C

Untersuchung von Serumproben im EIA-Anti-HBc und Vergleich mit dem CORAB™-Test

450 Serumproben von Blutspendern der Blutbank in Düsseldorf wurden im EIA-Anti-HBc nachuntersucht. Davon wurden 42 als Anti-HBc-positiv gewertet. Die Untersuchung im Radioimmunoassay hatte bei den gleichen Serumproben 44 Anti-HBc-positive Proben ergeben. Sämtliche 42 im EIA-Anti-HBc-positive Blutspender waren auch im RIA positiv gewesen. Die beiden Blutspender, die im RIA positiv waren und im EIA nicht entdeckt worden waren, waren in der anschließenden Verdünnungsreihe im RIA bis 1:8, bzw. 1:32 Anti-HBc-positiv. Von den 42 Serumproben, die in beiden Tests Anti-HBc-positiv waren, wurden die ersten 12 zur Titerbestimmung in einer Verdünnungsreihe untersucht. Im folgenden werden die im EIA und im RIA ermittelten Titer gegenübergestellt.

	EIA Titer	RIA Titer
1	1: 2048	1: 512
2	1: 64	1: 256
3	1: 32	1: 128
4	1: 4096	1: 4096
5	1: 128	1: 128
6	1:16384	1:32768
7	1: 1024	1: 1024
8	1: 1024	1: 2048
9	1: 8192	1: 4096
10	1: 256	1: 512
11	1: 2048	1: 8192
12	1: 32	1: 32

Tabelle II.3: Untersuchung des Anti-HBc-Titers im EIA und im RIA

Spezifität und Sensitivität

Im Vergleich zum CORAB^{TM}-Test ist der hier beschriebene Enzymimmunoassay etwas weniger sensibel und spezifisch in seiner Reaktion auf Anti-HBc.

Anzahl der untersuchten Proben : 450
davon Anti-HBc-positiv: 44

im EIA-Anti-HBc positiv : 42
falsch positiv : 0
falsch negativ : 2

$$\text{Spezifität} = 1 - \frac{\text{falsch positiv + falsch negativ}}{\text{Anzahl der Proben}} \times 100\% = 99{,}5\%$$

$$\text{Sensitivität} = 1 - \frac{\text{falsch negativ}}{\text{wahr positiv}} \times 100\% = 95{,}5\%$$

Diskussion

Im Gegensatz zum vorher entwickelten EIA-HBcAg, dessen Anwendungsbereich beschränkt ist, hat der EIA-Anti-HBc nach wie vor einen festen Platz in der Routinediagnostik der Hepatitis-B. Der hier entwickelte Enzymimmunoassay beruht ebenso wie der CORAB^{TM}-Test auf einer Inhibition des Konjugates durch Anti-HBc, das sich in den Proben befindet.
Die Vorbeschichtung der Mikrotiterplatten wurde mit dem monospezifischen Antikörper gegen HBcAg durchgeführt. Gegenüber dem EIA-HBcAg erwies sich eine höhere Konzentration des Anti-HBc von 1:100 als überlegen. Zur weiteren Beschichtung wurde das aus der Leber C präparierte HBcAg in einer Verdünnung von 1:2 benutzt.
Verdünnungsreihen von Proben, die bei verschiedenen Temperaturen unterschiedlich lang mit dem enzymmarkierten Konjugat inkubiert wurden, zeigten mit Zunahme der Inkubationszeit höhere Extinktionswerte und damit weniger spezifische Ergebnisse. Dieses Phänomen wurde bei höheren Verdünnungen noch deutlicher. Es wurde daher zur Probenuntersuchung eine relativ niedrige routinemäßige Verdünnung von 1:100 gewählt und die Inkubationszeit des Konjugates mit einer Stunde kürzer gehalten als beim EIA-HBcAg mit drei Stunden.
Da dieses Phänomen nur beim Anti-HBc-Inhibitionstest auftritt, ist eine kinetische Erklärung möglich. Die Annahme ist, daß enzymmarkierte Antikörper als die größeren Moleküle auch langsamer sind als unmarkierte Antikörper und daß um die spezifischen Bindungsstellen des HBcAg an der Mikrotiterwand ein Fließgleichgewicht zwischen enzymmarkierten und unmarkierten Antikörpern besteht. Daraus kann man folgern, daß die schnelleren unmarkierten Antikörper häufiger die spezifische HBcAg-Bindung verlassen und sie auch schneller wieder eingehen. Die markierten Antikörper finden anfangs weniger spezifische Bindungsstellen, besetzen diese jedoch länger als unmarkierte. Kurze Inkubationszeiten begünstigen daher unmarkierte Antikörper, lange Inkubationszeiten begünstigen markierte Antikörper, die für kurze Inkubationszeiten zu langsam

reagieren. Für lange Inkubationszeiten gilt, daß die schnelleren Antikörper mit der Zeit immer weniger freie Bindungsstellen vorfinden, da diese noch von den langsamen enzymmarkierten Antikörpern des Konjugates besetzt sind.
Die Konzentration des Konjugates mit den besten Ergebnissen wurde in einer Verdünnungsreihe bei 1:8 gefunden. Dieses ist im Vergleich zum EIA-HBcAg 50x höher. Vermutlich gleicht diese höhere Konzentration der langsamen Antikörper im Konjugat das oben beschriebene Phänomen noch etwas aus.
Sowohl Spezifität als auch Sensitivität des EIA-Anti-HBc sind etwas geringer einzustufen als die des CORAB^{TM}-Tests, mit dem er verglichen wurde. Der zeitliche Aufwand zur Durchführung dieses EIA beträgt zunächst einmal 2 Tage, die zur Vorinkubation der Mikrotiterplatte benötigt werden. Diese 2 Tage dienen jedoch mehr der Testvorbereitung als der eigentlichen Testdurchführung. Die Testdurchführung umfaßt einmal 3 Stunden Probeninkubation, 1 Stunde Inkubation des Konjugates und 20 Minuten Substratinkubation, insgesamt also eine Zeit von 4 Stunden und 20 Minuten in 5 Arbeitsschritten, einschließlich Auswertung des Tests. Damit ist der EIA-Anti-HBc zeit- und arbeitsaufwendiger als der CORAB^{TM}-Test. Seine Vorteile liegen darin, daß keine radioaktiven Isotopen verwendet werden und eine damit verbundene Belastung der Umwelt und eine Gefährdung des Laborpersonals durch jahrelangen Umgang mit strahlenden Substanzen entfällt. Ein weiterer Vorteil ist die einfache und preiswerte Testauswertung. Die Kosten dieses selbstentwickelten EIA-Anti-HBc sind wesentlich geringer als die des kommerziellen Tests.
Insgesamt ist dieser Test zwar arbeitsintensiver und weniger empfindlich, jedoch auch preiswerter und umweltfreundlicher als der Radioimmunoassay.

III. Entwicklung eines Enzymimmunoassays zur Bestimmung von Anti-HBc-IgM

Einführung

Die zusätzlichen Möglichkeiten, die die Bestimmung des IgM-Anteils des Anti-HBc in der Hepatitis-B-Diagnostik eröffnet, wurden im Kapitel "Fragestellung und Zielsetzung" schon erwähnt. Da Anti-HBc-IgM im Serum früher auftritt als Anti-HBc-IgG, ermöglicht sein Nachweis eine Frühdiagnose oder die rasche Bestätigung einer akuten Hepatitis-B. Schable und Maynard (55) fanden bei zwei Schimpansen mit einer HBV-Infektion Anti-HBc-IgM etwa drei bis vier Wochen nach dem Auftreten des HBsAg im Serum. Sechs Wochen später wechselte beim Anti-HBc die vorherrschende Immunglobulinklasse vom IgM zum IgG.
Es wurden verschiedene Methoden entwickelt, um eine Aufteilung des IgG- und IgM-Anteiles zu erreichen. Die physikalische Trennung durch Dichtegradient-Zentrifugation ist ebenso möglich wie die Absorption des IgG-Anteiles durch Zugabe von Staphylokokkenprotein A. Weiterhin kann ein Konjugat entwikkelt werden, das sich spezifisch gegen die IgM-Anteile einer Probe richtet (Anti-IgM) und diese nachweist.
1978 benutzten Duermeyer et al. (13) zur Beschichtung der Mikrotiterplatte ein Serum, das sich gegen die μ-Kette des IgM-Moleküls richtete (Anti-μ), um Anti-HAV der IgM-Klasse nachzuweisen. 1981 beschrieben Stute und Duermeyer (58) einen Test zum Nachweis von Anti-HBc-IgM in ELISA-Technik. Sie benutzten zur Beschichtung der Mikrotiterplatten ebenfalls Antikörper gegen die μ-Kette der IgM-Moleküle.

Testprinzip des EIA-Anti-HBc-IgM

Anti-μ Anti-HBc-IgM HBcAg Anti-HBc-HRPO OPD + UP

Ein kommerzielles Serum, das Antikörper gegen μ-Ketten (Anti-μ) enthält, wird an die Wände der Mikrotiterplatten adsorbiert. In Proben befindliches Anti-HBc der IgM-Klasse bindet sich spezifisch an diese Antikörper. Anschließend wird HBcAg zugegeben, das sich an das Anti-HBc-IgM bindet. Die nachfolgende Inkubation mit dem enzymmarkierten Konjugat und Substrat macht das gebundene HBcAg und Anti-HBc-IgM sichtbar. Enthält die untersuchte Probe Anti-HBc-IgM, so ist bei 492 nm Absorption eine hohe Extinktion zu erwarten.

Materialien und Methoden

Festphase
Mikrotiterplatten aus PVC der Firma Cooke wurden zum Testansatz benutzt.

Beschichtung mit Anti-μ
Zur Beschichtung der Mikrotiterplatte wurde kommerzielles Serum verwendet (Firma DAKO, Kopenhagen, Dänemark). Das Serum enthält Antikörper gegen μ-Ketten, die allein in IgM-Molekülen gefunden werden. Antikörper dieses Serums, die sich gegen die Antikörper der Immunglobulinklasse G richten, wurden durch Inkubation mit 1 ml Nabelschnurblut pro 1 ml Anti-μ-Serum absorbiert. Das Nabelschnurblut ist negativ für Anti-HBc und Anti-HBs und enthält nur mütterliche Antikörper der IgG-Klasse.

HBcAg
Als HBcAg-positive Lösung wurden die Überstände der Leber C/2 verwendet. Dazu waren die Proben P_0 bis P_5 der einzelnen Überstände zusammengegeben und durchmischt worden.

Konjugat
Monospezifisches Anti-HBc des Patientenserums K. wurde nach Fällung, Zentrifugation und Dialyse nach der Beschreibung von Nakane und Kawaoi (44) mit dem Enzym Meerrettichperoxidase markiert.

Kontrolle des Konjugates
Bei mehreren Versuchen zu den einzelnen Bedingungen des Tests wurde kommerzielles Anti-HBe-J^{125}-Reagenz aus dem ABBOTT-HBe^{TM}-Testkit verwendet, um die zweite Hälfte einer Mikrotiterplatte in herkömmlicher RIA-Technik auszuwerten.

Nachstehende Testanleitung gibt die Standardmethode des EIA-Anti-HBc-IgM wieder:

1) Beschichtung einer Mikrotiterplatte mit 100 µl Anti-µ-Serum, 1:5000 verdünnt in Phosphatpuffer, pH 8,0, 0,01 M.
Inkubation für 3 Stunden bei 37 °C.

2) Mikrotiterplatte fünfmal waschen mit 200 µl tweenhaltiger Waschlösung (Firma Organon, Oss, Niederlande).

3) Zugabe von 100 µl Probe, 1:1000 verdünnt in Phosphatpuffer, pH 8,0, 0,01 M, mit Zusatz von 1% Tween20..
Inkubation für 4 Stunden bei 37 °C.

4) Waschen der Mikrotiterplatte wie unter Punkt 2 beschrieben.

5) Zugabe von 100 µl HBcAg, 1:2 verdünnt in Phosphatpuffer, pH 8,0, 0,01 M, mit Zusatz von 1% Tween 20.
Inkubation bei Raumtemperatur über Nacht.

6) Waschen der Mikrotiterplatte wie unter Punkt 2 beschrieben.

7) Zugabe von 100 µl Konjugat (Anti-HBc-HRPO), 1:50 verdünnt in Phosphatpuffer, pH 8,0, 0,01 M, mit Zusatz von 1% Tween 20 und 20% negativem Humanserum.
Inkubation für 3 Stunden bei 37 °C.

8) Waschen der Mikrotiterplatte wie unter Punkt 2 beschrieben.

9) Zugabe von 100 µl Substrat (OPD + UP).
Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit.

10) Zugabe von 100 µl 3N H_2SO_4 zur Beendigung der Enzymreaktion.

11) Photometrische Bestimmung der Extinktion der Proben bei 492 nm gegen Leerwerte, die physiologische Kochsalzlösung enthielten und anschließend mit Substrat und 3N H_2SO_4 inkubiert wurden.

Auswertung des Tests

Als Anti-HBc-IgM-positives Kontrollserum wurde die Probe eines Patienten verwendet, die 2 Wochen nach der ersten HBsAg-positiven Serumprobe entnommen wurde. Im Vergleich zum Serum anderer Blutspender erbrachte dieses im Anti-HBc-IgM-Test eine deutliche Reaktion mit einem Anti-HBc-IgM-Titer von 1:256000.

Als negative Kontrolle wurde das Serum eines Blutspenders verwendet, das im CORAB^{TM}-Test Anti-HBc-negativ war. Als zweite Anti-HBc-IgM-negative Kontrolle wurde das Serum eines Blutspenders mitgeführt, das Anti-HBc-positiv war, jedoch im EIA-Anti-HBc-IgM nicht reagierte. Das bedeutet, daß dieses Serum nur Anti-HBc der IgG-Klasse und nicht der IgM-Klasse enthält. Weiterhin war dieses Serum im RIA HBsAg-positiv und HBeAg-negativ. Dieses Serum stammte von einem Patienten, der vor 10 Monaten eine akute Hepatitis-B-Infektion durchgemacht hatte. Der Grenzwert errechnet sich aus dem 2,2-fachen des Mittelwertes der negativen Kontrollen. Proben, deren Extinktion höher liegt als dieser Grenzwert, gelten als Anti-HBc-IgM-positiv.

Ergebnisse

Die in der Testanleitung angegebenen Verdünnungen der Proben, des Konjugates, des HBcAg und des Anti-μ-Serums zur Beschichtung der Mikrotiterplatten waren das Ergebnis von Vorversuchen. Die Vorbeschichtung mit kommerziellem Anti-μ-spezifischem Serum wurde aus Kostengründen in so starker Verdünnung durchgeführt, wie es der Test zuließ. Die Anti-HBc-IgM-haltige Probe wurde relativ hoch verdünnt, um Störungen des Tests durch eine Interferenz anderer Serumbestandteile zu vermeiden. HBcAg und das enzymmarkierte Konjugat wurden so gewählt, daß sie in der Auswertung die klarsten Ergebnisse zeigten.

Nachuntersuchung von 30 HBsAg-positiven Patientenseren

30 Seren von Patienten, die im AUSRIA^{R}II-125 zum ersten Mal HBsAg-positiv waren, konnten im EIA-Anti-HBc-IgM nachuntersucht werden. Der Test wurde in der Standardform durchgeführt.

Proben-Nr.						
Extinktion	1	2	3	4	5	6
	0,122	0,276	0,169	0,145	0,484	0,367
	7	8	9	10	11	12
	1,108	0,098	0,863	0,225	0,239	0,187
	13	14	15	16	17	18
	1,460	0,302	0,128	0,143	0,211	0,267
	19	20	21	22	23	24
	0,192	0,731	0,126	0,160	0,355	0,070
	25	26	27	28	29	30
	0,114	0,238	0,159	0,210	0,172	0,457
	Mittelwert K_{pos} : 1,407					
	Mittelwert K_{neg1} (Anti-HBc-neg) : 0,078					
	Mittelwert K_{neg2} (Anti-HBc-pos) : 0,089					
	Grenzwert : 0,184					

Tabelle III.1: Nachuntersuchung von 30 Patientenseren, die das erste Mal HBsAg-positiv waren

Von den untersuchten 30 Seren reagierten 18 Anti-HBc-IgM-positiv und 12 Anti-HBc-IgM-negativ. Insgesamt 12 Proben befanden sich in der Nähe des Grenzwertes (Grenzwert $\pm$ 0,050 Extinktion).
Von 26 Patienten konnten in dem Zeitraum von 2-3 Wochen nach der ersten Feststellung des HBsAg im Serum weitere Proben untersucht werden.

Proben-Nr.	1	2	3	4	5	6
Extinktion	0,145	-	-	0,136	0,629	0,411
	7	8	9	10	11	12
	0,768	0,216	0,840	0,319	0,220	0,254
	13	14	15	16	17	18
	0,982	0,289	0,318	0,194	0,172	0,245
	19	20	21	22	23	24
	0,136	0,684	-	0,129	0,343	0,092
	25	26	27	28	29	30
	0,220	0,194	0,125	0,286	-	0,672
	Mittelwert K_{pos} : 1,162					
	Mittelwert K_{neg1} (Anti-HBc-neg) : 0,058					
	Mittelwert K_{neg2} (Anti-HBc-pos) : 0,055					
	Grenzwert : 0,124					

Tabelle III.2: Untersuchung von 26 Serumproben 2-3 Wochen nach der ersten Feststellung von HBsAg im Serum

Von den 26 untersuchten Patientenseren reagierten jetzt 25 Anti-HBc-IgM-positiv, 1 Serum war weiterhin negativ. 7 Proben lagen in Grenzwertnähe (Grenzwert $\pm$ 0,050 Extinktion). Nach 6 Wochen waren alle verfügbaren Proben bis auf eine Ausnahme (Probe 24) Anti-HBc-IgM-positiv geworden. Nur noch 3 Proben befanden sich in Grenzwertnähe.

Verlaufskontrolle des Anti-HBc-IgM-Spiegels über 10 Wochen
Von einem kooperativen Patienten waren während seines stationären Aufenthaltes 25 Serumproben erhältlich und im EIA-Anti-HBc-IgM untersucht worden. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich vom ersten Auftreten des HBsAg bis etwa 10 Wochen danach.

Proben-Nr. / Extinktion					
	1	2	3	4	5
	0,066	0,130	0,200	0,140	0,120
	6	7	8	9	10
	0,132	0,190	0,240	0,300	0,310
	11	12	13	14	15
	0,340	0,400	0,404	0,505	0,430
	16	17	18	19	20
	0,355	0,280	0,320	0,365	0,380
	21	22	23	24	25
	0,292	0,250	0,330	0,410	0,335
	Mittelwert K_{pos} : 0,952				
	Mittelwert K_{neg1} (Anti-HBc-neg) : 0,105				
	Mittelwert K_{neg2} (Anti-HBc-pos) : 0,090				
	Grenzwert : 0,216				

Tabelle III.3: Untersuchung der Serumproben eines Patienten vom ersten Auftreten das HBsAg an bis etwa 10 Wochen danach

Die erste Serumprobe, die im EIA-Anti-HBc-IgM positiv reagierte, war die Probe Nr. 8. Von da an bleiben die Proben Anti-HBc-IgM-positiv bis über den Beobachtungszeitraum hinaus. Der Anti-HBc-Nachweis im CORAB^{TM}-Test gelang erst zwei Wochen später ab Probe Nr. 12.

Bestimmung des Anti-HBc-IgM-Titers
Von den oben untersuchten HBsAg-positiven 30 Patientenseren wurde die Höhe des Anti-HBc-IgM-Titers bestimmt. Untersucht wurde - soweit möglich - die erste und die letzte verfügbare Probe, um einen Titerverlauf zu erhalten.
Tabelle III.4 zeigt die Ergebnisse der Titerbestimmung der ersten Serumprobe Nr. 13, die den höchsten Anti-HBc-IgM-Titer aufwies.

1:1	1:10	1:100	1:1000	1:2000	1:4000
1,275	1,157	>2,0	1,175	1,330	1,100

1:8000	1:16000	1:32000	1:64000	1:128000
0,893	0,645	0,783	0,577	0,455

1:256000	1:512000
0,190	0,135

Mittelwert K_{pos}	: 1,224
Mittelwert K_{neg1} (Anti-HBc-neg)	: 0,068
Mittelwert K_{neg2} (Anti-HBc-pos)	: 0,093
Grenzwert	: 0,177

Tabelle III.4: Bestimmung des Anti-HBc-IgM-Titers der Serumprobe Nr. 13

In Tabelle III.5 werden die Anti-HBc-IgM-Titer der übrigen Proben wiedergegeben.

Proben-Nr.	1. Untersuchung	nach 2-3 Wochen	nach 6 Wochen
1	neg	1: 64000	1:128000
2	1: 8000	-	-
3	neg	-	-
4	neg	1: 32000	1:128000
5	1:128000	1:128000	1: 64000
6	1:128000	1: 32000	-
7	1: 16000	1:128000	1: 8000
8	neg	1: 64000	1: 32000
9	1: 32000	1: 64000	-
10	1: 64000	1: 64000	-
11	1: 64000	1:128000	1: 32000
12	1: 32000	1: 16000	-
13	1:256000	1: 64000	1: 16000
14	1:128000	1: 8000	-
15	neg	1:128000	1:128000
16	neg	1: 64000	1: 32000
17	1: 32000	1: 16000	-
18	1: 64000	1:128000	-
19	1: 32000	1:128000	1: 4000
20	1: 16000	1: 32000	-
21	neg	-	-
22	neg	1: 64000	1: 16000
23	1: 16000	1: 32000	-
24	neg	neg	neg
25	neg	1:128000	1: 64000
26	1: 64000	1:128000	-
27	neg	1: 64000	1: 16000
28	1: 64000	1: 32000	-
29	neg	-	-
30	1:128000	1: 64000	1: 32000

Tabelle III.5: Bestimmung der Anti-HBc-IgM-Titer der 30 HBsAg-positiven Patientenseren

Die Verlaufsbeobachtung der Anti-HBc-IgM-Titer zeigte in den meisten Fällen einen Anstieg gegenüber dem ersten Titer. Die letzte Titerbestimmung nach 6 Wochen zeigte entweder schon einen Titerabfall oder einen gleichbleibenden Titer an. Bei einem Patienten (Serumprobe Nr. 24) konnte trotz HBsAg-Nachweises kein Anti-HBc-IgM bestimmt werden. Dieses Serum war HBeAg-negativ und Anti-HBc-positiv. Von 3 Patienten (Serumprobe Nr. 3, 21, 29), die bei der ersten Untersuchung Anti-HBc-IgM-negativ waren, standen keine weiteren Proben zur Verfügung. Ein Titer unter 1:1000 wurde bei keinem Patienten gefunden.

Vergleich des enzymmarkierten Konjugates mit Anti-HBe-J^{125}

Zur Kontrolle des selbsterstellten enzymmarkierten Konjugates wurden die in Tabelle III.1 untersuchten Proben im Test zweimal angesetzt. Die Mikrotiterplatte wurde anchließend halbiert. Die erste Hälfte der Mikrotiterplatte wurde mit dem enzymmarkierten Konjugat in Enzmimmunoassay-Technik, die zweite Hälfte mit Anti-HBe-J^{125}-Reagenz in Radioimmunoassay-Technik ausgewertet.
Tabelle III.6 gibt die gemessenen Impulsraten wieder. Zum Vergleich wurden die Extinktionen aus Tabelle III.1 nochmals aufgeführt.

Proben-Nr.	1	2	3	4	5	6
Impulsr.	140	2387	179	134	3031	1748
Extinktionen	0,122	0,276	0,169	0,145	0,484	0,376
	7	8	9	10	11	12
	3495	83	2560	1338	1871	143
	1,108	0,098	0,863	0,225	0,239	0,187
	13	14	15	16	17	18
	3250	1145	104	71	454	841
	1,460	0,302	0,128	0,143	0,211	0,267
	19	20	21	22	23	24
	833	1324	156	120	2592	119
	0,192	0,731	0,126	0,160	0,355	0,070
	25	26	27	28	29	30
	99	688	172	963	164	2045
	0,114	0,238	0,159	0,210	0,172	0,457
	Mittelwert K_{pos} : 3712 (1,407)					
	Mittelwert K_{neg1} (Anti-HBc-neg) : 112 (0,078)					
	Mittelwert K_{neg2} (Anti-HBc-pos) : 79 (0,089)					
	Grenzwert : 209 (0,184)					

Tabelle III.6: Vergleich der Ergebnisse aus Tabelle III.1 in EIA- und RIA-Auswertung

In beiden Tests werden die gleichen Serumproben als Anti-HBc-IgM-negativ und -positiv gefunden. Nur Probe Nr. 12 war im RIA als negativ gewertet worden, während sie im EIA positiv war. Der Anti-HBc-IgM-Titer betrug 1:32000. Eine Testwiederholung für Probe Nr. 12 ergab erneut im EIA ein positives und im RIA ein negatives Ergebnis.

Untersuchung im EIA-Anti-HBc-IgM und im CORAB^{TM}-Test

Die 30 HBsAg-positiven Serumproben wurden ebenfalls im CORAB^{TM}-Test auf ihren Anti-HBc-Gehalt untersucht. Eine Gegenüberstellung der beiden Tests ergab, daß der Anti-HBc-IgM-Nachweis etwa 2 Wochen früher gelang als der Anti-HBc-Nachweis.

	EIA-Anti-HBc-IgM Anti-HBc-IgM	CORAB™-Anti-HBc-IgG
1	2 Wochen	4 Wochen
2	0 "	-
3	-	-
4	2 "	2 "
5	0 "	2 "
6	0 "	2 "
7	0 "	0 "
8	2 "	2 "
9	0 "	2 "
10	0 "	0 "
11	0 "	0 "
12	0 "	2 "
13	0 "	2 "
14	0 "	0 "
15	2 "	4 "
16	2 "	4 "
17	0 "	2 "
18	0 "	0 "
19	0 "	0 "
20	0 "	2 "
21	-	-
22	2 "	2 "
23	0 "	2 "
24	neg	0 "
25	2 "	2 "
26	0 "	2 "
27	2 "	4 "
28	0 "	4 "
29	-	-
30	0 "	4 "

Tabelle III.7: Untersuchung der 30 Serumproben im EIA-Anti-HBc-IgM und im CORAB™-Test - Dauer des Auftretens einer positiven Reaktion in den beiden Tests in Wochen nach dem erstmaligen HBsAg-Nachweis

Untersuchung von Blutspendern im EIA-Anti-HBc-IgM

An der Blutbank in Saarbrücken wurden 1283 gesunde Blutspender im EIA-Anti-HBc-IgM untersucht. 38 Blutspender (3%) reagierten im Test positiv und wurden auf die übrigen Hepatitis-B-Marker hin untersucht. Dabei fand sich bei allen Anti-HBs in einem hohen Titer.

Daraufhin wurden 49 Anti-HBs-positive Seren im EIA-Anti-HBc-IgM nachuntersucht. 18 Seren (36,7%) waren Anti-HBc-IgM-positiv. Der höchste gemessene Titer war 1:104000.

Diskussion

Für den Aufbau des EIA-HBc-IgM wurde neben selbst erarbeiteten Materialien ein kommerzielles Anti-μ-Serum zur Beschichtung der Mikrotiterplatte verwendet. Dieses Serum enthielt Antikörper gegen die μ-Ketten des IgM-Moleküls. Um eventuell noch vorhandene Antikörper gegen andere menschliche Immunglobuline (vor allem IgG) aus dem Serum zu entfernen, wurde es zusätzlich noch mit Nabelschnurblut inkubiert, das in der Regel mütterliches IgG enthält, da größere Immunglobuline die Plazenta nicht passieren können und vom Kind noch keine IgM-Moleküle gebildet werden.
Das enzymmarkierte Konjugat und das HBcAg wurden in den beiden vorhergehenden Tests schon diskutiert. Ein direkter Vergleich des EIA mit einem kommerziellen Test war nicht möglich, da es keinen gab. Das enzymmarkierte Konjugat erwies sich gegenüber dem radioaktiven Konjugat als etwas besser, da dieses eine Serumprobe mit einem Anti-HBc-IgM-Titer von 1:32000 wiederholt als negativ einstufte.
Der Anti-HBc-IgM-Nachweis im EIA gelang im Durchschnitt 2 Wochen früher als der Anti-HBc-Nachweis im CORAB^{TM}-Test. Dieses stimmt mit dem überein, was Stute und Duermeyer (58) 1981 berichteten.
Eine Verdünnung der untersuchten Serumproben wurde mit 1:1000 relativ hoch gewählt, um eine Beeinflussung des EIA-Anti-HBc-IgM durch die Mitreaktion anderer IgM-Moleküle zu vermeiden. So wurde über falsch positive Ergebnisse berichtet, die durch den Rheuma-Faktor verursacht wurden (13). In dieser Untersuchung konnten keine falsch positiven Ergebnisse festgestellt werden. Die Spezifität des Tests wurde somit durch die Probenverdünnung erhöht. Weiterhin wurde die Spezifität für Anti-HBc-IgM durch die zweite negative Kontrolle bestätigt. Dieses Serum war Anti-HBc- und HBsAg-positiv und HBeAg-negativ. Die Ergebnisse der Anti-HBc-positiven Kontrolle des HBsAg-Trägers waren im Test ebenso negativ wie das Anti-HBc-negative Serum

eines gesunden Blutspenders. Daraus war zu schließen, daß im EIA-Anti-HBc-IgM tatsächlich der IgM- ohne den IgG-Anteil gemessen wurde.
Durch die Probenverdünnung war ein negativer Einfluß auf die Sensitivität des Tests nicht erkennbar. Die ermittelten Anti-HBc-IgM-Titer der 30 Patientenseren lagen immer höher als 1:1000. Der niedrigste Titer war 1:4000. Er war erst nach mehreren Wochen, als der Anti-HBc-IgM-Titer wieder abfiel, gemessen worden. Der höchste gemessene Titer war 1:256000.
Ein Patient war über den gesamten Beobachtungszeitraum Anti-HBc-IgM-negativ. Gleichzeitig war er HBeAg-negativ, HBsAg- und Anti-HBc-positiv. Bei diesem Patienten dürfte es sich um einen HBsAg-Träger handeln, der sich nach einer überstandenen Hepatitis-B-Infektion jetzt eine Hepatitis anderer Genese zugezogen hatte.
Eine Untersuchung an gesunden Blutspendern ergab in 3% der Fälle positive Ergebnisse im EIA-Anti-HBc-IgM. Die weitere Untersuchung dieser 3% zeigte für alle ein Anti-HBs in hohem Titer. Anschließend wurden andere Anti-HBs-positive Blutspenderseren auf Anti-HBc-IgM geprüft. 36,7% dieser Seren wiesen auch Anti-HBc-IgM auf.
Für eine Interpretation des EIA-Anti-HBc-IgM ist daher eine Bestimmung des HBsAg und des Anti-HBs erforderlich. Handelt es sich um das Serum eines HBsAg-positiven Patienten, so ist der Anti-HBc-IgM-Nachweis als Beweis einer akuten Hepatitis-B-Infektion anzusehen. Läßt sich Anti-HBc-IgM nicht nachweisen, so handelt es sich um einen HBsAg-Träger, der an einer Hepatitis anderer Ursache erkrankt ist. Ist bei einem Patienten mit den klinischen Zeichen einer Hepatitis HBsAg nicht mehr nachweisbar ("diagnostisches Fenster") (69), so kann anhand des Anti-HBc-IgM-Titerverlaufs die Diagnose gestellt werden. Bei hohem Anti-HBc-IgM-Titer mit anschließendem Titerabfall liegt eine Hepatitis-B vor. Läßt sich Anti-HBc-IgM wiederholt nicht nachweisen, so muß es sich um eine Hepatitis anderer Ursache handeln.

Wird zusätzlich zum Anti-HBc-IgM noch Anti-HBs nachgewiesen, so handelt es sich in der Regel um gesunde Probanden, die einen hohen Anti-HBs- und Anti-HBc-Titer aufweisen. Bei einer hohen Anti-HBc-Konzentration wird offenbar auch ein kleiner Prozentsatz IgM-Moleküle der Spezifität Anti-HBc gebildet, der in diesem empfindlichen Test nachweisbar wird.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung von drei Enzymimmunoassays zur Bestimmung von HBcAg, Anti-HBc und Anti-HBc-IgM.
Die Enzymimmunoassay-Technik wurde gewählt, weil sie dem steigenden Umweltbewußtsein eher Rechnung trägt als die Radioimmunoassay-Technik.
Die Präparation des für die Testentwicklung erforderlichen Antigens (HBcAg) erfolgte aus einer menschlichen Leber. Dabei wurde festgestellt, daß eine Erhitzung der Leberproben die Nachweisbarkeit des HBsAg während der Präparationsarbeiten minderte. Weiterhin zeigte sich eine Abhängigkeit der HBcAg-Ausbeute vom Erhitzungsgrad. Das meiste HBcAg konnte bei Temperaturen zwischen 65 ^{o}C und 80 ^{o}C aus der Leber gewonnen werden.
Der Antikörper Anti-HBc wurde aus dem Serum eines HBeAg-positiven Patienten präpariert. Es handelte sich dabei um monospezifisches Anti-HBc, da der Nachweis von HBsAg und HBeAg im Serum die Antikörper Anti-HBs und Anti-HBe ausschließt. Dieses monospezifische Anti-HBc ermöglichte erst den sicheren Nachweis von HBcAg aus der Leber, da in den verwendeten kommerziellen Radioimmunoassays stets ein Anti-HBe-/Anti-HBc-Gemisch vorlag.
Ein Vergleich des EIA-HBcAg mit dem ABBOTT-HBe^{TM}-Test und des EIA-Anti-HBc mit dem CORAB^{TM}-Test ergab geringe Vorteile für die beiden kommerziellen Radioimmunoassays in Spezifität, Sensitivität und im Arbeitsaufwand. Die Vorzüge der hier beschriebenen Enzymimmunoassays liegen in der Umweltfreundlichkeit, den geringeren Kosten und der einfachen und preiswerten photometrischen Auswertung.
Der EIA-Anti-HBc-IgM konnte mit keinem käuflichen Test verglichen werden. Er bringt zusätzliche Möglichkeiten für die Diagnostik einer Hepatitis-B bei HBsAg-Trägern und für den Fall, daß HBsAg zu Erkrankungsbeginn schon nicht mehr nachweisbar ist. Da Anti-HBc der IgM-Klasse im Serum etwas früher als Anti-HBc der IgG-Klasse auftritt, gelingt der Nachweis einer akuten

Hepatitis-B im beschriebenen EIA-Anti-HBc-IgM durchschnittlich 2 Wochen früher als der Anti-HBc-Nachweis im CORAB^{TM}-Test. Insgesamt bedeutet die Beobachtung des Anti-HBc-IgM-Titerverlaufs eine zusätzliche diagnostische Sicherheit und Kontrolle der akuten Hepatitis-B. Die Bedeutung des Anti-HBc-IgM-Nachweises zeigt neben den vielfachen Untersuchungen und Berichten in der Literatur die Tatsache, daß es in Kürze einen kommerziellen Test zur Anti-HBc-IgM-Bestimmung geben wird.
Die Anwendbarkeit der hier entwickelten Tests konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden und ihr diagnostischer Nutzen - vor allem des EIA-Anti-HBc-IgM - wurde beschrieben.
Die Tests zum Nachweis von HBcAg, Anti-HBc und Anti-HBc-IgM bedürfen noch einer weitergehenden Untersuchung ihrer Abhängigkeit von den einzelnen Einflußgrößen in einer umfassenden klinischen Studie.

Abkürzungen

Anti-HBc	Antikörper gegen Hepatitis-B-core-Antigen
Anti-HBe	Antikörper gegen Hepatitis-B-e-Antigen
Anti-HBs	Antikörper gegen Hepatitis-B-Oberflächen-Antigen
Anti-HBc-J^{125}	Jod^{125}-markierte Antikörper gegen HBcAg
Anti-HBe-J^{125}	Jod^{125}-markierte Antikörper gegen HBeAg
Anti-HBc-IgG	Antikörper gegen HBcAg der Immunglobulin-klasse G
Anti-HBc-IgM	Antikörper gegen HBcAg der Immunglobulin-klasse M
Anti-HBc-HRPO	mit Meerrettichperoxidase markierte Anti-körper gegen HBcAg
Anti-μ	Antikörper gegen die μ-Ketten der IgM-Moleküle
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent-assay
FDNB	Fluordinitrobenzol
HAV	Hepatitis-A-Virus
HBV	Hepatitis-B-Virus
HBcAg	Hepatitis-B-core-Antigen
HBeAg	Hepatitis-B-e-Antigen
HBsAg	Hepatitis-B-Oberflächen-Antigen
HRPO	Horseradish-peroxidase (Meerrettichperoxidase)
Leber C/2	zweite Aufarbeitung der Leber C
$NaBH_4$	Natriumborhydrid
NHS	negatives Humanserum
n. g.	nicht gemessen
NP-40	Nonionic detergent P 40
OPD	Ortho-Phenylen-diamin
RIA	Radioimmunoassay
RZ	Reinheitszahl
SDS	Sodium dodecyl sulphate
UP	Ureaperoxid
$Ü_1$	Überstand 1

Literaturverzeichnis

1) Almeida, J. D.; Rubenstein, D.; Stott, E. D.:
New Antigen - Antibody System in Australia-Antigen-Positive Hepatitis
In: Lancet (1971), S. 1225-1227

2) Arnold, W.:
Aktive und passive Immunprophylaxe bei Hepatitisvirus-Infektionen
In: Dt. Ärzteblatt 79 (1982), Nr. 50, S. 31-33

3) Barker, L. F.; Almeida, J. D.; Hoofnagle, J. H. et al.:
Hepatitis B Core Antigen: Immunology and Electron Microscopy
In: J. Virol. 14 (1974), S. 1552-1558

4) Brechot, C.; Pourcel, C.; Louise, A. et al.:
Detection of Hepatitis B Virus DNA Sequences in Human Hepatocellular Carcinoma in an Integrated Form
In: Prog. Med. Virol. 27 (1981), S. 99-102

5) Brzosko, W. J.; Madalinski, K.; Krawczynski, K. et al.:
Duality of Hepatitis B Antigen and Its Antibody. I. Immunofluorescence Studies
In: J. Infect. Dis. 127 (1973), S. 424-428

6) Budkowska, A.:
Immunochemical and Morphological Studies of Hepatitis B Core Antigen Isolated from the Nuclei of Hepatocytes
In: J. Infect. Dis. 135 (1977), S. 463-467

7) Budkowska, A.; Shile, J. W.-K.; Gerin, J. L.:
Immunochemistry and Polypeptide Composition of Hepatitis B Core Antigen (HBcAg)
In: J. Immunol. 118 (1977), S. 1300-1305

8) Budkowska, A.; Walicka, B.; Domaniewska, G. et al.:
Immunoelectro-Osmophoresis for the Detection of Antibody to Hepatitis B Core Antigen
In: New Engl. J. Med. 290`(1974), S. 1489-1490

9) Charnay, P.; Gervais, M.; Louise, A.; Galibert, F.; Tiollais, P.:
Biosynthesis of Hepatitis B Virus Surface Antigen in Escherichia Coli
In: Nature (London) 1980, 286, S. 893-895

10) Cohen, B. J.; Cossart, Y. E.:
Application of a Screening Test for Antibody to Hepatitis B Core Antigen
In: J. Clin. Pathol. 30 (1977), S. 709-713

11) Cohen, B. J.:
The IgM Antibody Responses to the Core Antigen of Hepatitis B Virus
In: J. Med. Virol. 3 (1978), S. 141-149

12) Dane, D. S.; Cameron, C. H.; Briggs, M.:
Virus-Like Particles in Serum of Patients with Australia-Antigen-Associated Hepatitis
In: Lancet (1970), S. 695-698)

13) Duermeyer, Willem:
Application of ELISA for the Diagnosis and Epidemiology of Hepatitis A
Amsterdam, 1980
(Doktorarbeit an der Medizinischen Fakultät der Universität Utrecht)

14) Endo, Y.; Gudat, F.; Bianchi, L. et al.:
Anti-HBc im Rahmen der Hepatitis-B-Virusinfektion: Korrelationen zu Entzündungsform und Virusexpression
In: Schweiz. med. Wschr. 108 (1978), S. 363-373

15) Engvall, E.; Perlmann, P.:
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in Protides of the Biological Fluids
In: Pergamon Press (1971), S. 553-556

16) Engvall, E.; Perlmann, P.:
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Quantitative Assay of Immunoglobulin G
In: Immunochem. 8 (1971), S. 871-874

17) Engvall, E.; Jonssen, K.; Perlmann, P.:
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Protein Antigen, Immunoglobulin G, by Means of Enzyme-Labelled Antigen and Antibody-Coated Tubes
In: Biochem. Biophys. Acta 251 (1971), S. 427-434

18) Fauvel, M.; Babink, L.; Sheaff, E. T. et al.:
Preparation of a Dane Core (Hepatitis B) Antigen from Human Plasma
In: Can. J. Microbiol. 21 (1975), S. 905-910

19) Fields, H. A.; Hollinger, F. B.; Desmyter, J. et al:
Biochemical and Biophysical Properties of Hepatitis B Core Particles Derived from Dane Particles and Infected Hepatocytes
In: Intervirol. 8 (1977), S. 336-350

20) Frösner, G. G.; Bannaski, H.; Brodersen, M. et al:
Die Bedeutung von Anti-HBc für die Diagnose der akuten und chronischen Hepatitis-B-Infektion
In: Medizintechnik 98 (1978), S. 130-135

21) Furuta, S.; Kiyosawa, K.; Nagata, A. et al.:
Clinical Significance of E-Antigen (Anti-E, with Special Reference to HBc-Antigen in the Liver
In: Gastroenterol. Jap. 12 (1977), S. 460-465

22) Furuta, S.; Nagata, A.; Kiyosawa, K. et al.:
HBsAg, HBcAg and Virus-Like Particles in Liver Tissue
In: Gastroenterol. Jap. 10 (1975), S. 208-214

23) Galibert, F.; Mandart, E.; Fitoussi, F. et al:
Nucleotide Sequence of the Hepatitis B Virus Genome (Subtype ayw) Cloned in E. Coli
In: Nature (London) 1979, 281, S. 646-650

24) Gerin, J. L.; Wai-Kuo Shih, J.; Hoyer, B. H.:
Biology and Characterization of Hepatitis B Virus
In: Viral Hepatitis
International Symposium 1981
Szmuness, W.; Alter, Harvey J.; Maynard, James
New York, The Franklin Institute Press, 1981, S. 49-55

25) Grady, G. F.; Kaplan, M. M.; Vyas, G. N.:
Antibody to Hepatitis B Core Antigen in Chronic Hepatitis and Primary Biliary Cirrhosis
In: Gastroenterol. 72 (1977), S. 590-593

26) Greenman, R. L.; Robinson, W. S.; Vyas, G. N.:
A Sensitive Test for Antibody against the Hepatitis B Core Antigen (Anti-HBc)
In: Vox Sang. 29 (1975), S. 77-80

27) Grob, P. J.; Frey-Wettstein, M.; Pfenninger, K. et al:
Persistence of Anti-HBc IgM in Healthy Individuals with Persistent High Titered Anti-HBs (Donors of Hepatitis B Immunoglobulin)
In: Viral Hepatitis
International Symposium 1981
Szmuness, W.; Alter, Harvey J.; Maynard, James
New York, The Franklin Institute Press, 1981, S. 725

28) Gudat, F.; Bianchi, L.; Finck, M. et al.:
Nuclear Fluoressence of Liver Cells for IgG in Viral Hepatitis B: Significance and Relation to Hepatitis B Core and Anti-Hepatitis B Core Formation
In: Klin. Wschr. 55 (1977), S. 329-336

29) Gust, J. D.:
Comparison of the Epidemiology of Hepatitis A and B
In: Viral Hepatitis
International Symposium 1981
Szmuness, W.; Alter, Harvey J.; Maynard, James
New York, The Franklin Institute Press, 1981, S. 129-143

30) Hansson, B. G.:
Persistence of Serum Antibody to Hepatitis B Core Antigen
In: J. Cin. Microbiol. 6 (1977), S. 209-211

31) Hess, G.; Arnold, W.:
Methodische Probleme des Hepatitis-B-Surface-Antigen (HBsAg)- und Hepatitis-B-Core-Antigen (HBcAg)-Nachweises auf Gewebsebene
In: Acta histochem. 58 (1977), S. 47-55

32) Hoofnagle, J. H.; Gerety, R. J.; Barker, L. F.:
Antibody to Hepatitis B Core Antigen
In: Am. J. Med. Scienc. 270 (1975), S. 179-187

33) Hoofnagle, J. H.; Gerety, R.; Ni, L. Y. et al.:
Antibody to Hepatitis B Core Antigen. A Sensitive Indicator of Hepatitis B Virus Replication
In: New Engl. J. Med. 290 (1974), S. 1336-1340

34) Hoofnagle, J. H.; Gerety, R. J.; Barker, L. F.:
Antibody to Hepatitis B Virus Core in Man
In: Lancet (1973), S. 869-873

35) Hoofnagle, J. H.; Seeff, L. B.; Bales, Z. B. et al.:
Type B Hepatitis after Transfusion with Blood Containing Antibody to Hepatitis B Core Antigen
In: New Engl. J. Med. 298 (1978), S. 1379-1383

36) Holland, P. V.:
Available Methods to Further Reduce Posttranfusion Hepatitis
In: Viral Hepatitis
International Symposium 1981
Szmuness, W.; Alter, Harvey J.; Maynard, James
New York, The Franklin Institute Press, 1981, S. 563-570

37) Howard, C. R.; Zuckerman, A. J.:
Core Antigen and Circulation Anticore Antibody in Hepatitis B Infection
In: J. Immunol. Meth. 14 (1977), S. 291-301

38) Huang, S.-N.:
Structural and Immunoreactive Characteristics of Hepatitis B Core Antigen
In: Am. J. Med. Scienc. 270 (1975), S. 131-139

39) Kojuna, M.; Udo, K.; Takahashi, Y. et al.:
Correlation between Titer of Antibody to Hepatitis B Core Antigen and Presence of Viral Antigens in the Liver
In: Gastroenterol. 73 (1977), S. 664-667

40) Krugman, S.; Hoofnagle, J. H.; Gerety, R. J. et al.:
Viral Hepatitis, Type B. DNA Polymerase Activity and Antibody to Hepatitis B Core Antigen
In: New Engl. J. Med. 290 (1974), S. 1331-1335

41) Lipman, M. B.; Hierholzer, W. J.; Schluederberg, A.:
Isolation of Cores from Hepatitis B Dane Particles
In: J. Infect. Dis. 128 (1973), S. 664-667

42) Moritsugu, Y.; Gold, J. W. M.; Wagner, J. et al.:
Hepatitis B Core Antigen
In: J. Immunol. 114 (1975), S. 1792-1798

43) Miyakawa, Y.; Mayumi, M.:
HBeAg - Anti-HBe System in Hepatitis B Virus Infection
In: Viral Hepatitis
International Symposium 1981
Szmuness, W.; Alter, Harvey J.; Maynard, James
New York, The Franklin Institute Press, 1981, S. 183-192

44) Nakane, P. K.; Kawaoi, A.:
Peroxidase Labelled Antibody, a New Method of Conjugation
In: J. of Histochem. and Cytochem. 22 (1974), S. 1084-1091

45) Neurath, A. R.; Szmuness, W.; Stevens, C. E. et al.:
Radioimmunoassay and Some Properties of Human Antibodies
to Hepatitis B Core Antigen
In: J. Gen. Virol. 38 (1978), S. 549-559

46) Neurath, A. R.; Huang, S.-N.; Strick, N.:
Some Properties of Hepatitis B Core Antigen Isolated from
Serum of Infected Humans
In: J. Gen. Virol. 39 (1978), S. 91-101

47) Niermeijer, P.; Gips, C. H.; Huizenga, J. R. et al.:
IgM-Anti-HBc as a Marker of Persistent and IgG-Anti-HBc as a
Marker of Past Hepatitis B Infection. A Longitudinal Study
over 5 Years
In: Acta Hepato-Gastroenterol. 25 (1978), S. 360-364

48) Omata, M.; Afrondakis, A.; Liew, Ch.-T. et al.:
Comparison of Serum Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) and
Serum Anticore with Tissue HBsAg and Hepatitis B Core Antigen
(HBcAg)
In: Gastroenterol. 75 (1978), S. 1003-1009

49) Overby, L. R.; Ling, C. M.:
Radioimmune Assay for Anticore as Evidence for Exposure to Hepatitis B Virus
In: Rush-Presbyt. St. Luke's Med. Bull. 15 (1976), S. 83-92

50) Overby, L. R.; Ling, C. M.; Decker, R. H. et al.:
Serodiagnostic Profiles of Viral Hepatitis
In: Viral Hepatitis
International Symposium 1981
Szmuness, W.; Alter, Harvey J.; Maynard, James
New York, The Franklin Institute Press, 1981, S. 169-182

51) Purcell, R. H.; Gerin, J. L.; Almeida, J. B. et al.:
Radioimmunoassay for the Detection of the Core of the Dane Particle and Antibody to It
In: Intervirology (1973/74), S. 231-243

52) Purcell, R. H.:
The Hepatitis Viruses: An Overview and Historical Perspective
In: Viral Hepatitis
International Symposium 1981
Szmuness, W.; Alter, Harvey J.; Maynard, James
New York, The Franklin Institute Press, 1981, S. 3-11

53) Robinson, W. S.; Marion, P.; Feitelson, M. et al.:
The Hepadna Virus Group: Hepatitis B and Related Viruses
In: Viral Hepatitis
International Symposium 1981
Szmuness, W.; Alter, Harvey J.; Maynard, James
New York, The Franklin Institute Press, 1981, S. 57-68

54) Roggendorf, M.; Deinhardt, F.:
Neuere Ergebnisse zur Struktur und Pathogenese der Hepatitis B und zur Charakterisierung ihres Erregers
In: Triangel 21 (1982), S. 123-131

55) Schable, C. A.; Maynard, J. E.:
Serodiagnosis of Acute Hepatitis B. Virus Infection Using a Modified Competitive Binding Radioimmunoassay
In: Viral Hepatitis
International Symposium 1981
Szmuness, W.; Alter, Harvey J.; Maynard, James
New York, The Franklin Institute Press, 1981, S. 609-610

56) Shikata, T.; Yoshizaki, Ch.; Okazaki, K. et al.:
HBc and HBs Antigen in Hepatocytes
In: Gastroenterol. Jap. 10 (1975), S. 199-207

57) Stute, R.:
Die serologische Diagnostik der Hepatitis B. Wertigkeit der Hepatitis B Marker
In: Hyg. Med. 5 (1980), S. 323-325

58) Stute, R.; Duermeyer, W.:
Application of ELISA for the Detection of Anti-HBc-IgM
In: Viral Hepatitis
International Symposium 1981
Szmuness, W.; Alter, Harvey J.; Maynard, James
New York, The Franklin Institute Press, 1981, S. 609

59) Szmuness, W.; Hoofnagle, J. H.; Stevens, C. E. et al.:
Antibody against the Hepatitis Type B Core Antigen
In: Am. J. Epidemiol. 104 (1976), S. 256-262

60) Takahashi, K.; Akahane, Y.; Gotanda, T. et al.:
Demonstration of Hepatitis B Antigen in the Core of Dane Particles
In: J. Immunol. 122 (1979), S. 275-279

61) Takahashi, T.; Nakagawa, S.; Hashimoto, T. et al.:
Large-Scale Isolation of Particles from Plasma Containing Hepatitis B Antigen and Demonstration of a Circular Double--Stranded DNA Molecule Extruding Directly from Their Cores
In: J. Immunol. 117 (1976), S. 1392-1397

62) Tiollais, P.; Charnay, P.; Vyas, G. N.:
Biology of Hepatitis B Virus
In: Science 213 (1981), S. 406-411

63) Tsuda, F.; Takahashi, T.; Takahashi, K. et al.:
Determination of Antibody to Hepatitis B Core Antigen by Means of Immune Adherence Hemagglutination
In: J. Immunol. 115 (1975), S. 834-838

64) Vandervelde, E. M.:
Acute Hepatitis: Significance of Antibody to Hepatitis B Core Antigen
In: J. Clin. Pathol. 31 (1978), S. 1140-1142

65) Van Weemen, B. K.; Schuurs, A. H. W. M.:
Immunoassay Using Antigen-Enzyme Conjugates
In: FEBS Letters 15 (1971), S. 232-235

66) Viral Hepatitis
International Symposium 1981
Szmuness, W.; Alter, Harvey J.; Maynard, James
New York, The Franklin Institute Press, 1981

67) Wisdom, G. B.:
Enzyme-Immunoassay
In: Clin. Chem. 22 (1976), S. 1243-1255

68) Yamada, G.; Nakane, P. K.:
Hepatitis B Core and Surface Antigens in Liver Tissue
In: Lab. Invest. 36 (1977), S. 649-659

69) Zachoval, R.; Deinhardt, F.; Roggendorf, M. et al.:
Virologische Grundlagen und Diagnostik der Virushepatiden
In: Dt. Ärzteblatt 79 (1982), Nr. 50, S. 21-30

Testanleitung

70) ABBOTT-HBe™. Radioimmunoassay for the Detection of Hepatitis B e-Antigen and/or Antibody to Hepatitis B e-Antigen.
Langen: ABBOTT, 1979

71) AUSAB®. Radioimmunoassay for the Detection of Antibody to Hepatitis B Surface Antigen.
Langen, ABBOTT, 1979

72) AUSRIA®II-125. Radioimmunoassay for the Detection of Hepatitis B Surface Antigen.
Langen: ABBOTT, 1979

73) CORAB™. Radioimmunoassay for the Detection of Antibody to Hepatitis B Core Antigen.
Langen: ABBOTT, 1979

74) CORZYME™. Enzyme Immunoassay for the Detection of Antibody to Hepatitis B Core Antigen.
Langen: ABBOTT, 1981

75) HAVAB™. Radioimmunoassay for the Detection of Antibody to Hepatitis A Virus.
Langen: ABBOTT, 1979

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Brüster für die Überlassung des Themas sowie für die Möglichkeit, die Versuche in seinem Institut durchzuführen.

Herrn Dr. Stute danke ich für die konstruktiven Anmerkungen und Anregungen bei der Versuchsplanung und -durchführung und für die Durchsicht des Manuskriptes.

Weiterhin gilt mein Dank allen, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit in irgendeiner Form behilflich waren.

Lebenslauf

Am 22. September 1955 wurde ich, Hermann Peters, als Sohn des Heinrich Peters und seiner Ehefrau, Katharina Peters, geb. Nüsse, in Lohne geboren.

Von 1961 bis 1966 besuchte ich die Volksschule in Lohne. 1966 wechselte ich zum Gymnasium Georgianum in Lingen und erreichte 1975 die allgemeine Hochschulreife. Im Wintersemester 1975/76 studierte ich ein Semester Geologie in Münster. Im Sommersemester 1976 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Universität Düsseldorf auf, das ich am 6. Mai 1982 mit dem dritten Teil des ärztlichen Staatsexamens erfolgreich abschloß.

Vom 1. Juli 1982 bis zum 30. September 1983 leistete ich meinen Grundwehrdienst als Stabsarzt bei der Marine ab.

Am 3. Mai 1983 heiratete ich meine Frau Maria Peters, geb. Eling, und wohne seither in Köln.

Seit dem 1. November 1983 bin ich als Assistenzarzt an der Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses in Solingen beschäftigt.

Druck u. Verarbeitung: Hundt Druck GmbH
Zulpicher Str. 220, 5000 Koln 41, Tel. (02 21) 44 41 52 / 42 61 67